

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL
μNS DE REOVIRUS AVIAR**

TESIS DOCTORAL

ALBERTO BRANDARIZ NÚÑEZ

2010

El **Dr. Francisco Javier Benavente Martínez**, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMA:

Que este trabajo de Tesis Doctoral titulado "**Caracterización de la proteína no estructural μ NS de reovirus aviar**", que presenta Alberto Brandariz Núñez para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, ha sido realizada en este Departamento bajo mi dirección y la del Dr. José Manuel Martínez Costas y, considerando que se haya concluida, autorizo su presentación para que pueda ser evaluada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo el presente informe:

Fdo: Francisco Javier Benavente Martínez

Fdo: José Manuel Martínez Costas

Fdo: Alberto Brandariz Núñez

Santiago de Compostela, 3 de Marzo de 2010.

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo la dirección de los doctores Francisco Javier Benavente Martínez y José Manuel Martínez Costas.

Alberto Brandariz Núñez ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia y Tecnología, para la realización de esta tesis (Proyecto BFU2004-05641/BMC).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Javier Benavente la oportunidad de dejarme entrar a formar parte de su grupo de investigación. También quería agradecer a mi co-director, el Dr. José Manuel Martínez Costas, sus consejos y su apoyo intelectual, ya que sin estos, esta tesis no sería posible.

Quiero agradecer también a mis compañeros de laboratorio su ayuda prestada y colaboración. A los que me ayudaron durante mis comienzos como Marcelo, Lois, Lorena y Patricia. A los que llegaron nuevos durante esta etapa como Sergio, Jose y Patricia F, Leticia, Iria. A los que han compartido mis alegrías y mis penas durante estos años de trabajo: Lisa, Javi, Irene (por sus continuas respuestas a mis preguntas) y especialmente a Rebeca, por su gran apoyo técnico, ya que sin este, esto no sería posible. A los químicos Juan, Cecilia, Olalla. A los “vecinos” Félix, Rubén, e Iria G, Mark y Pablo. Y como no, a mis compañeros de andanzas por las noches, los doctores: Juan Vallejo, Daniel Torrecilla y Miguel Ángel Fidalgo.

Finalmente, quiero dedicarle este trabajo a mis padres, y a mi hermano y a los colegas de Cambre: Gelucho, Fuci, Chucho (por sus grandes consejos a la hora de afrontar la etapa de tesis).

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

| | |
|--|-----------|
| 1. La familia <i>Reoviridae</i> | 3 |
| 2. El género <i>Orthoreovirus</i> | 4 |
| 3. Reovirus aviares | 5 |
| 3.1. Patología e importancia de los reovirus aviares | 5 |
| 3.2. Estructura y composición de los reovirus aviares | 6 |
| 3.2.1. La partícula viral | 6 |
| 3.2.2. El genoma reoviral | 8 |
| 3.2.3. Las proteínas virales | 9 |
| 3.3. Ciclo replicativo | 19 |
| 3.3.1. Entrada y desenvoltura de la cápside externa | 19 |
| 3.3.2. Expresión del genoma viral | 21 |
| 3.3.3. Morfogénesis y salida | 22 |
| 4. Factorías virales | 24 |
| 5. La proteína μNS de los reovirus | 26 |

II. OBJETIVOS35**III. MATERIALES Y MÉTODOS**

| | |
|---|-----------|
| 1. Material biológico | 39 |
| 1.1. Células eucariotas | 39 |
| 1.2. Virus | 39 |
| 1.3. Células procariotas | 41 |
| 1.4. Plásmidos parentales | 41 |
| 1.5. Plásmidos recombinantes | 42 |
| 1.6. Anticuerpos | 42 |
| 1.6.1. Anticuerpos primarios | 42 |
| 1.6.2. Anticuerpos secundarios | 43 |
| 2. Material no biológico | 44 |
| 2.1. Medios de cultivo | 44 |
| 2.2. Disoluciones y tampones | 45 |
| 3. Métodos | 46 |
| 3.1. Manipulación de células bacterianas | 46 |
| 3.1.1. Crecimiento y mantenimiento de bacterias | 46 |
| 3.1.2. Obtención de bacterias competentes y transformación | 46 |
| 3.2. Manipulación de ácidos nucleicos | 47 |
| 3.2.1. Purificación de DNA plasmídico | 47 |
| 3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 47 |
| 3.2.3. Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) | 47 |
| 3.2.4. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA | 48 |

| | |
|---|----|
| 3.2.5. Corte y unión de fragmentos de DNA | 48 |
| 3.2.6. Mutaciones puntuales del DNA..... | 49 |
| 3.2.7. Construcciones de plásmidos recombinantes | 49 |
| 3.2.7.1. Generación de deleciones de μ NS | 49 |
| 3.2.7.2. Generación de quimeras de μ NS (1) | 51 |
| 3.2.7.2.1 Generación de quimeras de μ NS (2) | 55 |
| 3.3. Expresión y manipulación de proteínas..... | 58 |
| 3.3.1. Creación de baculovirus recombinantes..... | 58 |
| 3.3.2. Expresión de proteínas con baculovirus | 62 |
| 3.3.3. Purificación de inclusiones..... | 62 |
| 3.3.4. Purificación de la proteína GFP asociada a inclusiones | 63 |
| 3.3.5. Purificación de luciferasa asociada a inclusiones..... | 64 |
| 3.3.6. Análisis electroforético en geles SDS-PAGE..... | 64 |
| 3.4. Manipulación de cultivos celulares y virus | 64 |
| 3.4.1. Condiciones de manipulación..... | 64 |
| 3.4.2. Propagación y conservación de líneas celulares..... | 65 |
| 3.4.3. Obtención de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF)..... | 65 |
| 3.4.4. Crecimiento y titulación de virus | 66 |
| 3.4.5. Transfección de células eucariotas con plásmidos de expresión transitoria | 66 |
| 3.4.6. Ensayo del doble híbrido en células de mamífero..... | 67 |
| 3.4.7. Determinación de la actividad de la luciferasa..... | 67 |
| 3.5. Técnicas inmunológicas | 68 |
| 3.5.1. Transferencia de proteínas e inmunodetección por Western-blot..... | 68 |
| 3.5.2. Inmunofluorescencia | 68 |
| 3.5.3. Microscopia electrónica de barrido | 69 |
| 3.6. Tratamiento bioinformático de las secuencias..... | 69 |

IV. RESULTADOS

| | |
|--|-----------|
| 1. Relación entre las factorías virales del reovirus aviar y las inclusiones formadas por la proteína μNS y los agrosomas | 73 |
| 2. Caracterización del estatus oligomérico de la proteína μNS..... | 76 |
| 3. Identificación de la región mínima de μNS que retiene la capacidad para formar inclusiones..... | 79 |
| 3.1. Identificación de los dominios de μ NS implicados en la formación de inclusiones | 86 |
| 3.1.1. Dominio Intercoil (IC)..... | 86 |
| 3.1.2. Dominio Coil 1 (C1)..... | 87 |
| 3.1.3. Dominio C-Terminal (C-Tail) | 90 |
| 3.1.4. Dominio Coil 2 (C2)..... | 95 |
| 4. Identificación de regiones de μNS que son reclutadas específica y eficientemente a las inclusiones de μNS..... | 97 |
| 4.1. Identificación de regiones de μ NS que arrastran eficientemente a la proteína GFP hacia las inclusiones de μ NS..... | 100 |

| | |
|---|------------|
| 4.2. Identificación de regiones de μ NS sin fusionar o fusionadas a GFP que son reclutadas específica y eficientemente a las inclusiones que forma μ NS-Mi..... | 103 |
| 5. Desarrollo de un método para purificar proteínas expresadas en células de insecto basado en su reclutamiento a las inclusiones que forman las proteínas μNS y μNS-Mi..... | 107 |
| 5.1. Protocolo de purificación utilizando inclusiones de μ NS | 109 |
| 5.2. Protocolo de purificación utilizando inclusiones de μ NS-Mi | 112 |
| 5.3. Purificación de las inclusiones de GFP- μ NS y GFP- μ NS-Mi..... | 114 |
| 5.4. Purificación de Luciferasa activa | 116 |
| 5.4.1. Expresión de luciferasa y luciferasa-Intercoil: la fusión del Intercoil no afecta a la actividad de la luciferasa..... | 116 |
| 5.4.2. Purificación de la luciferasa-Intercoil activa..... | 118 |
| 6. Desarrollo de un sistema para detectar la interacción de proteínas en el citoplasma de células eucariotas..... | 121 |
| 6.1. Las proteínas μ NS y GFP- μ NS reclutan eficientemente a p53-Intercoil | 122 |
| 6.2. La presencia de p53-Intercoil en las inclusiones que forma μ NS atrae a ellas a su ligando el antígeno T de SV40 de células Cos-7..... | 125 |
| 6.3. La presencia de p53-Intercoil en las inclusiones que forma μ NS atrae a ellas al antígeno T de SV40 expresado en células CEF | 128 |
| 6.4. μ NS-Mi y su versión fusionada con GFP reclutan eficientemente a p53-Intercoil y permiten detectar la asociación p53-antígeno T | 130 |
| 7. μNS puede formar inclusiones nucleares | 137 |
| 7.1. Las inclusiones nucleares que forman las diferentes versiones de μ NS capturan a la proteína GFP y al dominio GAL4 etiquetados con el dominio Intercoil..... | 140 |
| 7.2. Las inclusiones nucleares que forman las diferentes versiones de μ NS reclutan eficientemente a p53-Intercoil y permiten detectar la interacción p53-Ag.T en el núcleo..... | 143 |
| 8. La proteína μNS y μNS-Mi reclutan simultáneamente a p53-Intercoil y GFP-Intercoil | 150 |
| V. DISCUSIÓN | |
| 1. Relación entre las factorías virales del reovirus aviar y las inclusiones formadas por la proteína μNS y los agresomas | 157 |
| 2. Caracterización del estatus oligomérico de la proteína μNS | 159 |
| 3. Identificación de los dominios de μNS implicados en la formación de inclusiones | 161 |

| | |
|---|------------|
| 4. Desarrollo de un método para purificar proteínas en células de insecto y para detectar asociaciones de proteínas basados en su reclutamiento a las inclusiones formadas por las proteínas μNS y μNS-Mi..... | 167 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 175 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 179 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------|---|
| aa | aminoácidos |
| Ag.T | antígeno T |
| ATP | adenosina 5' trifosfato |
| ARV | reovirus aviar |
| α - | anticuerpo anti- |
| bp | pares de bases |
| BSA | seroalbúmina bovina |
| CEF | fibroblastos embrionarios de pollo |
| CA-C | dominio C-terminal de la proteína CA de la cápside del VIH |
| C1 | Coil 1 |
| C2 | Coil 2 |
| CT | C-tail |
| Da | dalton |
| °C | grados Celsius |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-fenilindol dihidroclórico |
| DMEM | medio Eagle modificado por Dulbecco |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | deoxinucleótido trifosfato |
| dsRNA | ácido ribonucleico de doble cadena |
| DTT | ditiotreitól |
| EDTA | etilen diamino tetracético |
| EGFP | proteína fluorescente verde mejorada |
| FBS | suero fetal bovino |
| GFP | proteína fluorescente verde |
| HIV-1 | virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 |
| h | hora |
| HA | epítipo de hemaglutinina |
| hpi | horas post-infección |
| hpt | horas post-transfección |
| IC | Intercoil |
| IgG | inmunoglobulina |
| ISVPs | partículas subvirales intermedias |
| kDa | kilodalton |
| kv | kilovoltios |
| LB | Luria-Bertami |
| λ A | Lambda A, proteína mayoritaria del core |
| λ B | Lambda B, proteína minoritaria del core |
| λ C | Lambda C, proteína del core |
| λ 1 | Lambda 1, proteína mayoritaria del core de reovirus de mamífero |
| λ 2 | Lambda 2, proteína minoritaria del core de reovirus de mamífero |
| M | molaridad |
| Met | metionina |
| min | minutos |
| ml | mililitro |
| MOI | multiplicidad de infección |
| mM | milimolar |
| mRNA | ácido ribonucleico mensajero |
| MRV | reovirus de mamífero |
| MW | peso molecular |

| | |
|-------------|--|
| μ A | Mu A, proteína minoritaria del core |
| μ B | Mu B, proteína mayoritaria de la cápside externa |
| μ g | microgramo |
| μ l | microlitro |
| μ M | micromolar |
| μ NS | Mu NS, proteína no estructural |
| μ 2 | Mu2, proteína minoritaria del core de reovirus de mamífero |
| NLS | señal de localización nuclear |
| NP-40 | nonidet P-40 |
| nm | nanómetro |
| ORF | pauta abierta de lectura |
| p10 | proteína no estructural del reovirus aviar |
| p17 | proteína no estructural del reovirus aviar |
| p53 | proteína supresora de tumores |
| PAGE | electroforesis en geles de poliacrilamida |
| PBS | tampón fosfato salino |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PEG | polietilenglicol |
| PKR | proteína kinasa R |
| RNA | ácido ribonucleico |
| RNasa | ribonucleasa |
| rpm | revoluciones por minuto |
| RT | temperatura ambiente |
| s | segundo |
| SEM | microscopía electrónica de barrido |
| SDS | dodecil sulfato sódico |
| SDS-PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS |
| Sf9 | células de insecto de <i>Spodoptera frugiperda</i> |
| ssRNA | ácido ribonucleico de cadena sencilla |
| SV40 | virus del simio 40 |
| σ A | Sigma A, proteína mayoritaria del core |
| σ B | Sigma B, proteína mayoritaria de la cápside externa |
| σ C | Sigma C, proteína de unión a la célula |
| σ NS | Sigma NS, proteína no estructural |
| σ 1 | Sigma 1, proteína de unión al receptor de reovirus de mamífero |
| σ 2 | Sigma2, proteína mayoritaria del core de reovirus de mamífero |
| TEMED | N-N'-N'-N'-tetrametil-etilendiamina |
| T_m | temperatura de desnaturalización o de fusión |
| TPB | caldo de triptosa fosfato |
| Tris | tris (hidroximetil)-aminometano |
| ufp | unidad formadora de placa |
| wt | tipo salvaje |

I. INTRODUCCIÓN

1. LA FAMILIA *REOVIRIDAE*

La familia *Reoviridae* engloba una serie de virus que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y que se caracterizan por: i) replicar en el citoplasma de la célula infectada; ii) carecer de envoltura lipídica; iii) poseer un genoma fragmentado formado por 10-12 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA); iv) contener dos o tres cubiertas proteicas concéntricas, con un diámetro externo de 70-85 nm; y v) utilizar estrategias similares para la replicación y expresión de sus genomas.

Estos virus, que infectan a un amplio espectro de huéspedes incluyendo humanos, mamíferos, peces, insectos y plantas, inducen una gran variedad de manifestaciones clínicas en los organismos infectados, que pueden ser desde asintomáticas hasta fatales. El prefijo reo (Respiratory Enteric Orphan) fue propuesto inicialmente por A. Sabin (1959) para agrupar a una serie de virus que habían sido aislados de los tractos respiratorio y gastrointestinal de individuos aparentemente sanos, de ahí el término “orphan”, y que previamente habían sido incluidos dentro de la familia de los echovirus. Basándose en las características estructurales de los viriones, en el número de segmentos genómicos y en las estrategias del ciclo replicativo, los miembros de esta familia se han agrupado en doce géneros diferentes (Tabla 1). Sólo los *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus* y *Coltivirus* infectan a humanos y otros vertebrados, mientras que los demás géneros infectan a plantas, insectos y peces (Attoui *et al.*, 2000; Nibert y Schiff, 2001; Mertens *et al.*, 2005).

| TABLA 1 - MIEMBROS DE LA FAMILIA <i>REOVIRIDAE</i> | | | |
|---|--------------------|--------------------------|---|
| Genero | Nº de Genes | Hospedador | Representante |
| <i>Orthoreovirus</i> | 10 | Vertebrados | Reovirus de mamífero tipo 3 |
| <i>Orbivirus</i> | 10 | Vertebrados/ insectos | Virus de la lengua azul (BTV) |
| <i>Rotavirus</i> | 11 | Mamíferos | Rotavirus humano |
| <i>Coltivirus</i> | 12 | Humanos | Virus de la fiebre de la garrapata de colorado (CTFV) |
| <i>Aquareovirus</i> | 10 | Peces | Virus del "Golden shinner" (Notemigonus crysoleucas) |
| <i>Cypovirus</i> | 10 | Insectos | Virus de la polihedrosis citoplasmática (CPV) |
| <i>Fijivirus</i> | 10 | Insectos | Virus de la enfermedad de Fiji (FDV) |
| <i>Phytoreovirus</i> | 12 | Plantas/insectos | "Wound tumor virus" (WTV) |
| <i>Oryzavirus</i> | 12 | Plantas | Virus de la aspereza infecciosa del arroz (RRSV) |
| <i>Seadornavirus</i> | 12 | Vertebrados/ Insectos | "Banna virus" (BAV) y "Kadipiro virus" (KDV) |
| <i>Mycoreovirus</i> | 11-12 | Hongos | Mycoreovirus1 (MYRV1) |
| <i>Idnoreovirus</i> | 10 | Insectos | Idnoreovirus 1 |

Tabla 1. Miembros de la familia *Reoviridae*

2. EL GÉNERO *ORTHOREOVIRUS*

El género *Orthoreovirus*, al que comúnmente se le denomina reovirus, agrupa a aquellos componentes de la familia *Reoviridae* que poseen diez segmentos genómicos encerrados en el interior de una doble cubierta proteica de 70-90 nm de diámetro externo (Jordan y Mayor, 1962). Su distribución en la naturaleza es muy amplia, habiéndose detectado en mamíferos, aves, reptiles e insectos, aunque los dos grupos más importantes de este género son los reovirus de mamífero y los reovirus aviares. Los reovirus aviares y de mamífero comparten muchas características morfológicas y físicoquímicas, pero difieren en el rango de hospedador, patogenicidad y capacidad codificante del genoma, así como en varias propiedades serológicas y biológicas

(Spandidos y Graham, 1976a; Schnitzer, 1985; Rosenberger *et al.*, 1989; Duncan y Sullivan, 1998; Bodelón, *et al.*, 2001). Así, solo los reovirus aviáres causan fusión de las células infectadas, y solo los reovirus de mamífero poseen actividad hemaglutinante (Nibert y Schiff, 2001). Al género *Orthoreovirus* también pertenecen dos reovirus de mamífero fusogénicos denominados Virus de la Bahía de Nelson (“Nelson Bay virus”) y el virus del mono Babuíno (“Baboon reovirus”), así como varios reovirus fusogénicos aislados de distintas especies de reptiles (Mertens, 2004).

3. REOVIRUS AVIARES

Los intentos de clasificación de los reovirus aviáres de acuerdo con sus propiedades serológicas han resultado infructuosos debido a que tienen un alto grado de variabilidad antigénica, como lo demuestran las reacciones cruzadas observadas en los ensayos de neutralización. El análisis filogenético basado en la proteína σC permitió agrupar a los reovirus aviáres en 5 divisiones genotípicas, siendo más dispersos los virus aislados de Holanda, Alemania y Taiwán que los encontrados en Australia y Estados Unidos (Kant *et al.*, 2003). No obstante, no se ha podido establecer una correlación entre genotipos particulares y sus niveles patogénicos.

A pesar de la gran importancia que tienen los reovirus aviáres en la industria avícola, todavía se desconocen muchos aspectos de la biología molecular de estos agentes, debido a que los virólogos moleculares han prestado mucha más atención al estudio de los reovirus de mamífero, considerados el prototipo del género *Orthoreovirus*.

3.1. Patología e importancia de los reovirus aviáres

Los reovirus aviáres son importantes patógenos de aves y causan importantes pérdidas económicas en la industria avícola. Estos virus, que infectan a todo tipo de aves, son ubicuos entre las aves de corral, aunque a menudo las infecciones son asintomáticas y sólo algunos reovirus aviáres altamente patogénicos causan un alto índice de mortalidad (Rosenberger *et al.*, 1989). Las cepas virulentas son responsables de varios síndromes infecciosos, de los cuales el más importante es la artritis aviar o tenosinovitis infecciosa (Olson, 1978), que se caracteriza por la presencia de lesiones en

las vainas tendinosas y en las membranas sinoviales de las articulaciones, muy similares a las lesiones encontradas en la artritis reumatoidea humana. El reovirus aviar también parece ser el agente causante de algunas enfermedades intestinales en pollos y de la enfermedad de la cresta azul en pavos. Por otra parte, numerosos investigadores han observado que los reovirus aviares son capaces de inducir miocarditis y hepatitis en pollos en infecciones experimentales. Otra de las enfermedades en las que se ha involucrado al reovirus aviar es el síndrome de malabsorción, una virosis entérica que bloquea el proceso de la absorción del alimento, por lo que las aves infectadas sufren retraso en el crecimiento, presentan diarreas de tipo mucoide, desarrollan alteraciones óseas y presentan niveles bajos de caroteno en sangre. A pesar de que este síndrome ha sido asociado con varios agentes etiológicos diferentes, se ha podido comprobar que las cepas de reovirus aviar 1733 y 2408 son capaces de inducir esta enfermedad en infecciones experimentales de aves de corral. Al parecer, la susceptibilidad a las infecciones por reovirus aviares está relacionada con la edad, siendo las aves de mayor edad las más resistentes a las infecciones. La vía de transmisión principal es la fecal oral, aunque también se han reportado casos de infección por vía respiratoria y a través del huevo (revisado en Robertson y Wilcox , 1986; van der Heide, 2000; Jones, 2000).

El método principal de lucha contra las enfermedades reovirales consiste en vacunar a las aves jóvenes con vacunas atenuadas y administrar después virus inactivados a las aves reproductoras para que los pollos queden protegidos por los anticuerpos maternos. Muchas de las vacunas utilizadas en la actualidad se preparan a partir de la cepa S1133 aislada por van der Heide (van der Heide y Kalbac, 1975), aunque esas vacunas son poco efectivas contra algunas variantes antigénicas (Jones, 2000).

3.2. Estructura y composición de los reovirus aviares

3.2.1. La partícula viral

Los reoviriones aviares son partículas icosaédricas de 85 nm de diámetro y una densidad de 1,37 g/ml (Spandidos y Graham, 1976a; Zhang *et al.*, 2005a). Contienen un genoma compuesto por 10 segmentos de dsRNA encapsidado dentro de dos capas

proteicas concéntricas (Figura 1). Además, también contienen muchos oligonucleótidos de cadena simple y pequeño tamaño, ricos en adenina y de función desconocida (Spandidos y Graham, 1976a).

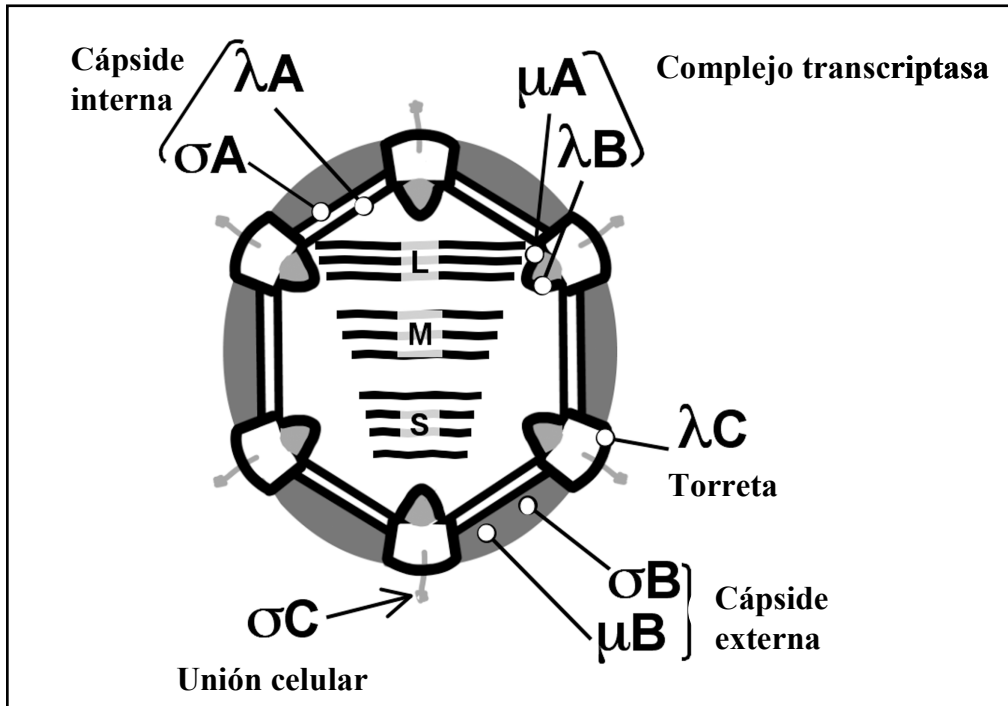


Figura 1. Distribución de las proteínas de reovirus aviar en el virión (Martínez-Costas *et al.*, 1997).

Varios estudios determinaron la distribución de las proteínas reovirales entre las dos capas proteicas del reovirus aviar S1133 (Schnitzer *et al.*, 1982; Martínez-Costas *et al.*, 1997). Los resultados de estos estudios revelaron que las proteínas μB, μBC, μBN, σB y σC son componentes de la cápside externa mientras que λA, λB, μA y σA son proteínas del core. La proteína λC es un componente de las dos capas y se extiende desde el core hasta la cápside externa (Figura 1).

Tanto los cores como las ISVPs tienen capacidad de transcripción en ensayos realizados *in vitro* (Martínez-Costas *et al.*, 1995). Los reoviriones purificados también poseen actividad de RNA polimerasa, aunque son incapaces de sintetizar transcritos enteros *in vitro*, sugiriendo que la actividad de elongación de la RNA polimerasa está regulada por características físicas de la partícula viral (Martínez-Costas *et al.*, 1995). Se cree que el centro activo de la RNA polimerasa de los reovirus aviares radica en la proteína λB.

Estudios de microscopía y reconstrucción de imágenes en 3D, así como análisis por difracción de rayos X de partículas del reovirus de mamífero han revelado con alta precisión las interacciones y ordenamiento de las proteínas estructurales en la partícula viral (Metcalf *et al.*, 1991; Dryden *et al.*, 1993; Reinisch *et al.*, 2000; Olland *et al.*, 2001; Liemann *et al.*, 2002; Odegard *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003, 2005b). Recientemente, se ha resuelto la estructura del reovirus aviar mediante análisis por criomicroscopía electrónica de viriones de la cepa 138 del reovirus aviar, y se compararon con la del reovirus de mamífero y *Aquareovirus*. Los resultados pusieron de manifiesto que existe una gran similitud estructural entre los reovirus aviáres y los reovirus de mamífero. Además el diámetro del reovirión aviar es 87 nm, sólo 0,3 nm más grande que el descrito para los reovirus de mamífero (Dryden *et al.*, 1993).

3.2.2. El genoma reoviral

El genoma de los reovirus aviáres está formado por diez segmentos de RNA de doble cadena, tres de la clase L (large o grande), tres de la clase M (medium o mediana) y cuatro de la S (small o pequeña) (Spandidos y Graham, 1976a, Varela y Benavente, 1994). Con excepción del segmento S1, que es tricistrónico, todos los demás genes son aparentemente monocistrónicos (Bodelon *et al.*, 2001) (Figura 2).

La cadena positiva de cada segmento genómico es idéntica a la del mRNA que transcribe, y contiene un cap de tipo 1 en su extremo 5', mientras que la cadena negativa, la cual es complementaria y antiparalela, contiene un grupo pirofosfato en esa posición (Martínez-Costas *et al.*, 1995). Los primeros siete nucleótidos del extremo 5' (GCUUUUU) y los últimos cinco del extremo 3' (UCAUC) están conservados en las cadenas positivas de todos los segmentos genómicos de los reovirus aviáres, lo que sugiere que estos extremos podrían actuar como señales de transcripción, replicación y/o encapsidación de los transcritos virales. Como ocurre con otros miembros de la familia *Reoviridae*, la coinfección de células aviáres con dos cepas reovirales distintas genera virus híbridos que contienen segmentos genómicos de ambos virus parentales. Este fenómeno, que se denomina reordenamiento ("reassorting") ha sido muy utilizado para caracterizar las propiedades fenotípicas de los segmentos genómicos virales.

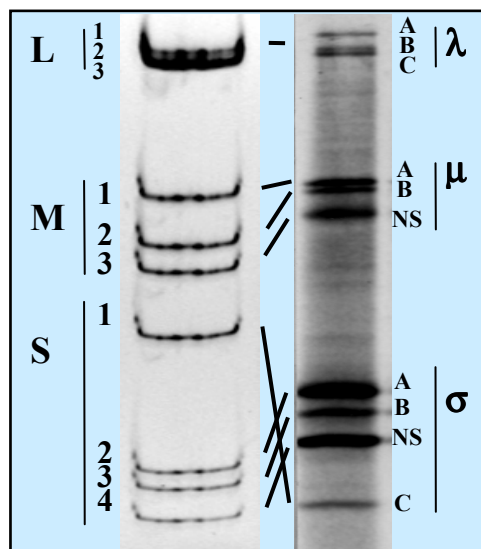


Figura 2. Relación entre los segmentos genómicos del reovirus S1133 y las proteínas que codifican. Las proteínas p10 y p17, debido a su pequeño tamaño, no aparecen en este tipo de gel (Varela y Benavente, 1994).

3.2.3. Las proteínas virales

El genoma del reovirus aviar codifica al menos 12 proteínas primarias, de las cuales 8 son estructurales que forman parte del virión, y 4 son “no estructurales” (NS), ya que se expresan en células infectadas, pero no forman parte de los reoviriones maduros (Martínez-Costas *et al.*, 1997; Varela y Benavente, 1994). Las proteínas codificadas por los genes de la clase L se denominan lambda (λ), las codificadas por la clase M, mu (μ) y los codificados por los de la clase S, sigma (σ) (Tabla 2 y Figura 2). A las proteínas estructurales de cada clase se les ha asignado un sufijo alfabético (λ A, λ B, etc.) según su movilidad electroforética, para distinguirlas de las de los reovirus de mamífero a las que se les había asignado un sufijo numérico (λ 1, λ 2, etc.). El reovirión aviar contiene al menos 10 proteínas estructurales diferentes, 8 de las cuales (λ A, λ B, λ C, μ A, μ B, σ A, σ B y σ C) son productos primarios de traducción de sus mRNAs, mientras que las otras dos, μ BN y μ BC, se originan por procesamiento proteolítico parcial del precursor μ B (Varela *et al.*, 1996).

Como hemos dicho, los reovirus aviares expresan cuatro proteínas no estructurales. Las proteínas mayoritarias μ NS y σ NS son codificadas por los genes M3 y S4 (Schnitzer *et al.*, 1982; Varela y Benavente, 1994), mientras que las minoritarias

p10 y p17 son codificadas por los dos primeros cistrones del gen tricistrónico S1 (Figura 3) (Bodelon *et al.*, 2001; Shmulevitz *et al.*, 2002).

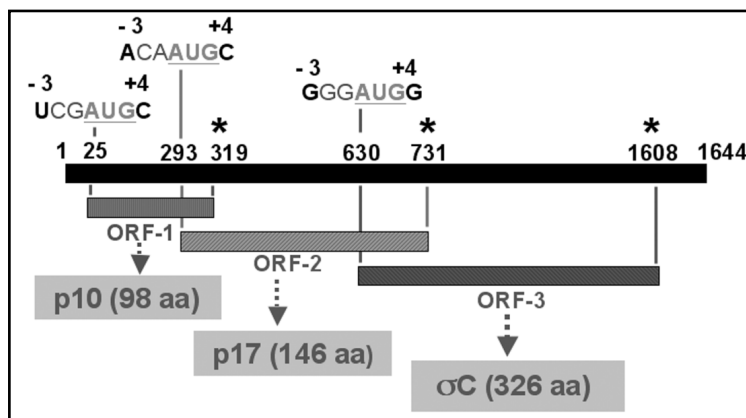


Figura 3. Organización cistronica del gen S1 de los reovirus aviares y secuencias que rodean al codón de iniciación de sus cistrones (Bodelón *et al.*, 2001). En la Figura se muestra el contexto de iniciación de la traducción para cada pauta abierta de lectura, señalándose con los números -3 y +4 las posiciones que, según Kozak (1991), son importantes para la eficiencia de la iniciación de la traducción. En paréntesis se indica el número de residuos aminoácidos que tiene cada una de las tres proteínas.

La identidad de los genes que codifican para cada uno de los polipéptidos de los reovirus aviares, se ha determinado por traducción in vitro de segmentos genómicos individuales desnaturalizados (Varela y Benavente, 1994). Los resultados demuestran que existe una correlación directa entre el tamaño del gen y el de la proteína que codifica, exceptuando el gen S1 (Figura 2). Este gen, que es el mayor de la clase S, expresa en células infectadas las proteínas no estructurales p10 y p17, y la proteína estructural σ C, la proteína estructural más pequeña del virus. La secuencia del gen S1 reveló que posee tres pautas abiertas de lectura (ORF), parcialmente solapadas y fuera de fase (Figura 3), y que σ C está codificada por el tercer ORF, el más próximo al extremo 3' del gen (Shapouri *et al.*, 1995). El estudio de las secuencias de nucleótidos que rodean los codones de iniciación del mRNA S1 reveló que, mientras que el codón de iniciación del primer cistron se encuentra en un contexto débil por carecer de purinas en las posiciones -3 y +4, el codón de iniciación AUG del tercer cistron tiene purinas en estas posiciones, por lo que tiene un contexto fuerte (Figura 3). El codón de inicio del segundo cistron tiene una A en -3 y una pirimidina en +4, pero estudios recientes indican que un nucleótido de adenina en posición -3 es suficiente para que el codón de iniciación posea un contexto fuerte (Kozak, 2002).

En la Tabla 2 se expone una relación de las actividades y propiedades conocidas de las proteínas virales, así como la localización de las proteínas estructurales en la partícula viral.

| dsRNA | Proteína | Localización | Función | Referencia |
|-------|--------------------|-----------------|--|--|
| L1 | λ A | Core | Estructural | Martínez-Costas <i>et al.</i> , 1997 |
| L2 | λ B | Core | Polimerasa? | Martínez-Costas <i>et al.</i> , 1997 |
| L3 | λ C | Core y Cápside | Guanililtransferasa | Martínez-Costas <i>et al.</i> , 1995; 1997 Hsiao <i>et al.</i> , 2002 |
| M1 | μ A | Core | Cofactor Polimerasa? | Martínez-Costas <i>et al.</i> , 1997 |
| M2 | μ B | Cápside externa | Internalización del virus | Varela <i>et al.</i> , 1996 |
| | μ BC, μ BN | Cápside externa | | |
| M3 | μ NS | No estructural | Formación de inclusiones virales, reclutamiento de proteínas virales | Tourís <i>et al.</i> , 2004a ; 2004b |
| S1 | σ C | Cápside externa | Unión a receptores celulares | Martínez-Costas <i>et al.</i> , 1997 |
| | p10 | No estructural | Fusión celular, Viroporina | Bodelón <i>et al.</i> , 2001; 2002 |
| | p17 | No estructural | Localización nuclear | Costas <i>et al.</i> , 2005 |
| S2 | σ A | Core | Unión a dsRNA, resistencia al interferón | Martínez-Costas <i>et al.</i> , 2000 González- López <i>et al.</i> , 2003 |
| S3 | σ B | Cápside externa | Estructural | Martínez-Costas <i>et al.</i> , 1997 |
| S4 | σ NS | No estructural | Unión a ssRNA, interacción con μ NS | Tourís <i>et al.</i> , 2004a ; 2005 Yin y Lee, 1998 |

Tabla 2. Proteínas del reovirus aviar; función y localización.

La proteína λ A, que es la proteína viral de mayor tamaño y que está codificada por el gen L1, forma parte de la cara interna del core (Figura 1) y se incorpora rápidamente a las factorías virales de células infectadas. En células transfectadas se distribuye por todo el citoplasma, pero se asocia con inclusiones cuando se co-expresa

con μ NS. Estos resultados sugieren que μ NS es la proteína encargada de llevar a λ A a las factorías virales en células infectadas (Tourís-Otero *et al.*, 2004b).

La proteína λ B, está codificada por el gen L2, y es un componente minoritario del core viral (Figura 1), que por su tamaño, número de copias en la partícula viral y localización en el interior del core, pudiera tratarse de la RNA polimerasa viral (Martínez-Costas *et al.*, 1997). El análisis de su secuencia, la cual ha sido identificada recientemente en nuestro laboratorio, parece corroborarlo (datos no mostrados).

La proteína λ C, esta codificada por el gen L3, y se extiende desde el interior del core hasta la superficie de la cápside externa (Figura 1) (Martínez-Costas *et al.*, 1997; Reinisch *et al.*, 2000). Pentámeros de la proteína λ C forman las torretas que se proyectan desde cada uno de los 12 ejes de simetría de orden 5 del core (Reinisch *et al.*, 2000). Esta proteína es la guanililtransferasa viral, la enzima responsable de la formación del cap en el extremo 5' de los mRNA del virus (Martínez-Costas *et al.*, 1995). Estudios realizados con una proteína λ C recombinante expresada en células de insecto, demostraron que la actividad de autoguanililación radica en un fragmento de 42 kDa de su extremo N-terminal y que el fragmento complementario de 100 kDa es prescindible para dicha actividad (Hsiao *et al.*, 2002).

La proteína μ A, codificada por el gen M1, es un componente minoritario del core (Figura 1, Martínez-Costas *et al.*, 1997). La secuencia aminoacídica de esta proteína se ha publicado recientemente (Noad *et al.*, 2006), pero todavía no hay estudios acerca de sus propiedades y función. Su homóloga en reovirus de mamífero, μ 2, interacciona con los microtúbulos y con la proteína no estructural μ NS, y se piensa que estas interacciones son las responsables de anclar las factorías virales a los microtúbulos, y así contribuir a la apariencia filamentosa de las factorías virales de muchas cepas de reovirus de mamífero, como se comentará más adelante (Parker *et al.*, 2002).

La proteína μ B, es el producto primario de traducción del gen M2 (Varela y Benavente, 1994). Esta proteína está miristoilada en su extremo amino, donde se ha identificado una secuencia consenso de miristoilación (Varela *et al.*, 1996). Una gran

parte de las moléculas de μB sintetizadas en células infectadas sufren un corte proteolítico cerca de su extremo N-terminal, generando un pequeño péptido miristoilado denominado μBN y un polipéptido de mayor tamaño denominado μBC (Figura 4). Tanto μB , como μBN y μBC forman parte de la cubierta externa del reovirión (Martínez-Costas *et al.*, 1997) (Figura 1). Además de formar parte de la estructura del virión, μBC parece cumplir un rol importante en la entrada del reovirus aviar a la célula hospedadora. El desensamblaje del reovirión va acompañado de dos cortes secuenciales cerca del extremo carboxilo de μBC , que generan los polipéptidos δ y δ' , y evidencias indirectas sugieren que este procesamiento es necesario para promover la interacción de la partícula viral con la membrana lisosomal y para facilitar la salida del core del endosoma al citoplasma (Duncan, 1996).

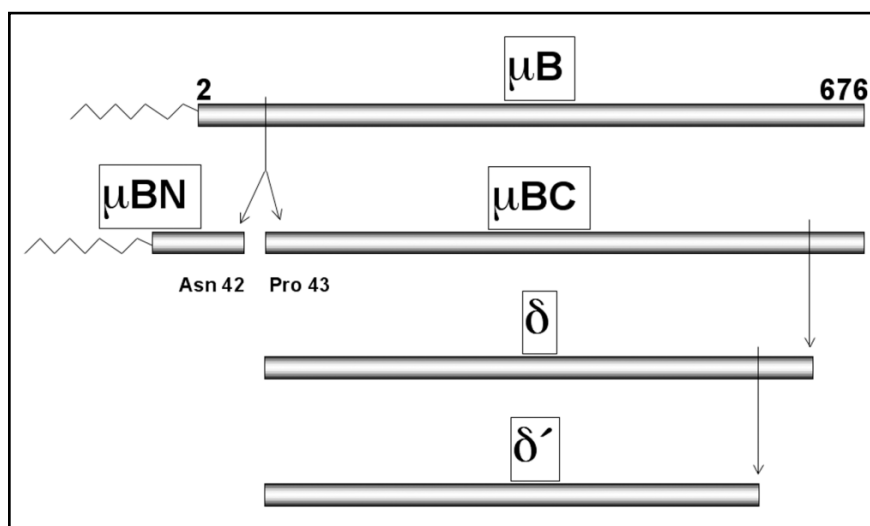


Figura 4. Esquema de la proteína μB y de su procesamiento. La proteína μB se encuentra miristoilada en su extremo amino. Entre los aminoácidos Asn42 y Pro43 sufre un corte proteolítico que da origen a μBN y μBC . Durante la entrada del virus a la célula, μBC sufre dos cortes proteolíticos cerca de su extremo carboxilo generando los polipéptidos δ y δ' .

La proteína μNS , es una proteína no estructural codificada por el gen M3 del reovirus aviar y tiene un peso molecular de 70 kDa (Varela y Benavente, 1994; Tourís-Otero *et al.*, 2004a). Dado que la caracterización de esta proteína es el objetivo fundamental de esta tesis, se describirá más adelante con detalle lo que se conocía de esta proteína antes de la realización de este trabajo.

La proteína σA , codificada por el gen S2, es uno de los componentes mayoritarios de la cápside interna del reovirus (Figura 1) (Martínez-Costas *et al.*, 1997).

Esta proteína se une muy fuertemente a dsRNA independientemente de la secuencia nucleotídica (Martínez-Costas *et al.*, 2000). En ensayos preliminares *in vitro*, se demostró que la proteína σA es capaz de revertir el estado antiviral inducido por el interferón, al prevenir la activación de la proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR). Se cree que la capacidad de σA para unir y secuestrar dsRNA desempeña un papel fundamental en la resistencia de los reovirus aviares frente a la actividad antiviral de los interferones (Martínez-Costas *et al.*, 2000; González-López *et al.*, 2003). En nuestro laboratorio se demostró recientemente que la proteína σA se acumula en el nucleolo y citoplasma de células aviares y que la presencia de σA en el nucleolo es independiente de factores virales. Ensayos realizados en células permeabilizadas con digitonina indicaron que la proteína σA penetra en el nucleolo por un mecanismo de transporte selectivo dependiente de las nucleoporinas del poro nuclear, pero independiente de factores citosólicos y de fuente de energía (Vázquez-Iglesias *et al.*, 2009).

El grupo del Dr. Mark van Raaij, con el que colaboramos, ha conseguido cristalizar la proteína σA (Hermo-Parrado *et al.*, 2007; Guardado-Calvo *et al.*, 2008, ver Figura 5). La estructura tridimensional de σA reveló que se trata de una proteína globular compuesta mayoritariamente por hélices alfa, y permitió identificar una posible región de unión a dsRNA, ya que mutaciones puntuales de argininas en dicha región (R155 y R273) eliminan la unión a dsRNA (Figura 5). Los datos estructurales, junto con ensayos de retardo en gel, microscopía electrónica y estudios de la velocidad de sedimentación de complejos σA -dsRNA sugieren que la unión de σA con dsRNA es cooperativa. Los resultados también pusieron de manifiesto que la longitud mínima del dsRNA necesario para unirse con σA está comprendida entre 14 y 18 bp (Guardado-Calvo *et al.*, 2008).

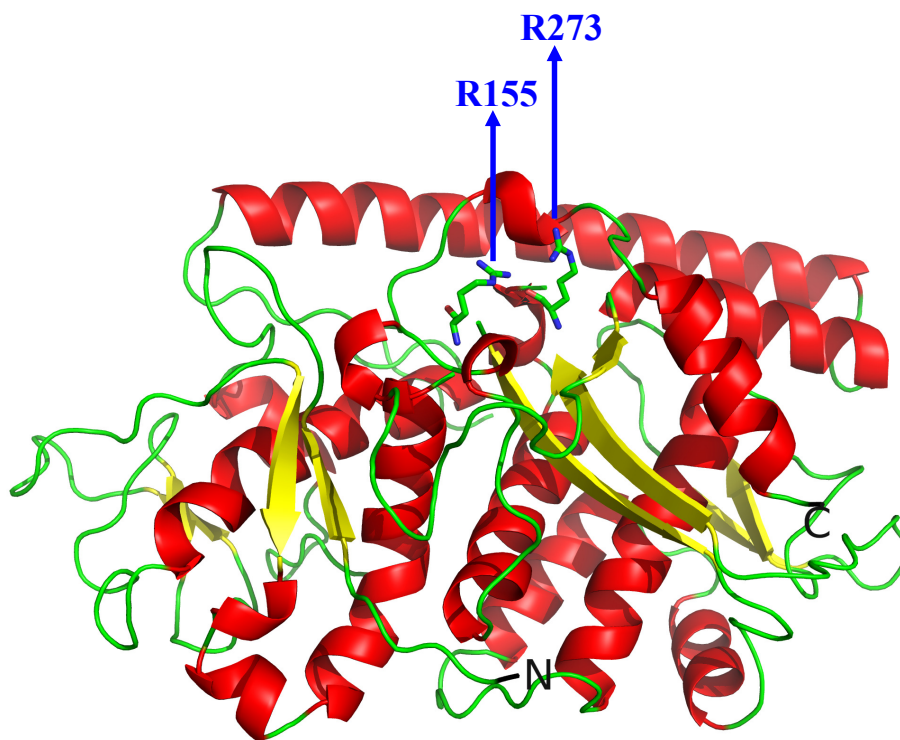


Figura 5. Estructura tridimensional de la proteína σA . Estructura tridimensional de la proteína σA donde se muestran los residuos básicos, argininas R155 y R273, que están muy expuestos sobre la superficie y muy próximos en la estructura espacial.

La proteína σB , que está codificada por el gen S3 del reovirus aviar, es un componente mayoritario de la cápside externa del virus (Figura 1, Martínez-Costas *et al.*, 1995; Varela *et al.*, 1996). En el citosol de células infectadas, la proteína σB , se asocia espontánea y rápidamente con μBN y μBC , para formar complejos ternarios heteroligoméricos, los cuales contienen cantidades estequiométricas de las tres proteínas virales (Tourís-Otero *et al.*, 2004b).

La proteína σC , que está codificada por el tercer cistron del gen S1, es una proteína minoritaria de la cápside externa (Figura 1). Esta proteína es la responsable de la unión del virus a la célula hospedadora, ya que es la única proteína viral de extractos de células infectadas capaz de unirse a células aviares, y su unión se puede inhibir por preincubación de las células con virus purificado (Grande *et al.*, 2000). La proteína σC es un homotrímero en estado nativo y se ha demostrado que sólo la forma oligomérica se une a los receptores de la superficie de células aviares (Grande *et al.*, 2002).

El grupo del Dr. vanRaaij ha cristalizado un fragmento C-terminal de σ C (residuos 117-326), que contiene el dominio globular de unión al receptor (Guardado *et al.*, 2005; 2009, ver Figura 6).

Gracias a los datos obtenidos por difracción de rayos X, y a la comparación de su secuencia con la de su homóloga de reovirus de mamífero, la proteína σ C se ha podido dividir en cuatro regiones, tres de las cuales se observan en la estructura resuelta: i) la primera comprende los aminoácidos 1-50 y posee una gran similitud de secuencia con su homóloga de mamífero σ 1 (38% identidad); es la región de unión a las partículas virales; ii) la segunda región está comprendida entre los aminoácidos 51 y 156 y consta de un triple “coiled-coil” conectado a la tercera región a través de una región que contiene Zn, el cual podría actuar funcionalmente como una región “bisagra”; iii) la tercera región, que comprende los aminoácidos 160-191, contiene dos repeticiones en triple beta espiral; iv) la cuarta región, residuos 196-326, es la cabeza globular de la proteína, donde cada monómero forma un barril beta que contacta con los otros dos para formar la zona globular por donde, presumiblemente, la proteína interacciona con los receptores celulares. Se ha propuesto que esta región es la responsable de iniciar la trimerización y de la correcta formación del trímero, aunque en estos procesos también podría desempeñar un papel importante la región “coiled-coil” del extremo amino (Guardado-Calvo *et al.*, 2005; 2009).

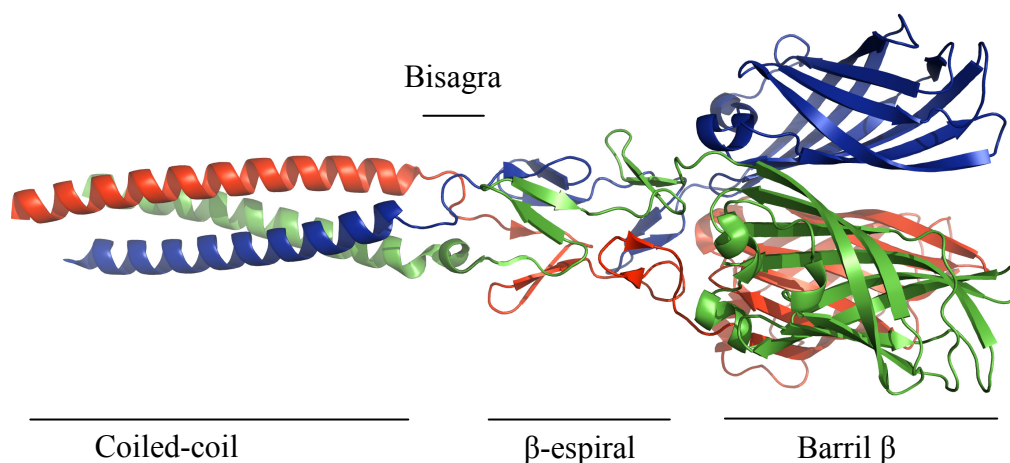


Figura 6. Estructura de la región 117-326 de σ C a una resolución de 3Å. (Guardado *et al.*, 2009). Se indican las diferentes regiones presentes en el trímero de σ C.

La proteína p10, es una proteína no estructural de 10,3 kDa codificada por la primera ORF del gen S1. La funcionalidad de este cistón se demostró utilizando anticuerpos específicos contra una p10 recombinante (Bodelon *et al.*, 2001; Shmulevitz *et al.*, 2002). Otros estudios han revelado que la proteína p10 es una proteína transmembranal de tipo 1, con un dominio central hidrofóbico que atraviesa la membrana y que separa dos dominios de tamaños similares: el carboxiterminal que se encuentra dentro y el aminoterminal que está fuera de la célula (Shmulevitz y Duncan, 2000) (Figura 7). La expresión de p10 en células transfectadas induce fusión de membranas, demostrando que p10 juega un papel importante en el fenotipo fusogénico de los reovirus aviares (Shmulevitz y Duncan, 2000; Bodelon *et al.*, 2001). Resultados de nuestro laboratorio revelaron que la expresión de la proteína p10 induce un aumento en la permeabilidad de la membrana tanto en bacterias como en células eucariotas, lo que sugiere que p10 es una vioporina que juega un papel importante en la modificación de la permeabilidad de la membrana producida por los reovirus aviares. Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales p10 desestabiliza las membranas. La observación de que el dominio fusogénico N-terminal de p10 es prescindible para la actividad permeabilizante, sugiere que las actividades fusogénica y desestabilizante de la membrana de la proteína p10 son mediadas por motivos distintos de la proteína (Bodelon *et al.*, 2002).

La proteína p17, está codificada por la segunda pauta de lectura abierta del gen S1 y hasta la fecha no se han encontrado homologías con ninguna otra proteína conocida, ya sea viral o celular. Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio han revelado que p17 se acumula en el núcleo de células infectadas con reovirus aviar y de células transfectadas. Experimentos de mutagénesis han demostrado que su localización nuclear se debe a una señal de localización nuclear funcional (NLS, “nuclear localization sequence”) ubicada cerca de su extremo C-terminal (Costas *et al.*, 2005). Estos estudios también han demostrado que p17 es una proteína recirculante, que se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma y que su presencia en el núcleo es dependiente del estado transcripcional de la célula.

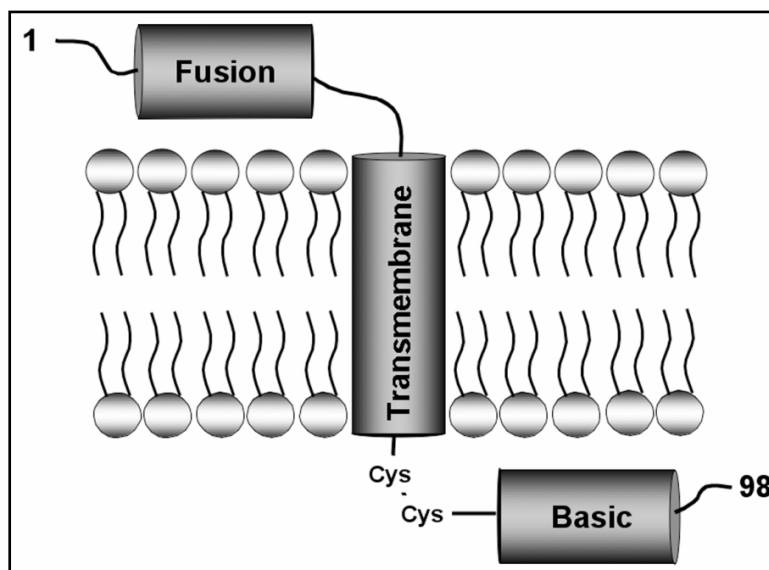


Figura 7. Esquema de los dominios de la proteína p10. La proteína p10 posee tres principales dominios; un dominio N-terminal extracelular de fusión y un dominio C-terminal intracelular básico, ambos separados por un dominio central transmembrana. Entre los dominios transmembrana y básico se localiza un motivo dicisteína que está palmitoilado y que es fundamental para la actividad fusogénica de p10 (Shmulevitz *et al.*, 2003).

La proteína σ NS, es una proteína no estructural codificada por el gen S4 del reovirus aviar (Schnitzer, 1985; Varela y Benavente, 1994). Se ha confirmado que esta proteína tiene capacidad de unión a ssRNA independientemente de la secuencia nucleotídica (Yin y Lee, 1998; Tourís-Otero *et al.*, 2005). Esta proteína se encuentra formando grandes complejos ribonucleoproteicos citoplasmáticos en las células infectadas (Tourís-Otero *et al.*, 2005); al eliminar el RNA de los complejos, σ NS se encuentra en forma de homodímeros y homotrímeros. También se ha demostrado que la proteína σ NS es reclutada hacia los viroplasmas por asociación directa con μ NS (Tourís-Otero *et al.*, 2004a). Esto, y el hecho de que presenta afinidad por ssRNA, sugiere que σ NS desempeña un papel importante en el empaquetamiento y replicación del RNA viral, aunque se necesitan más estudios para demostrar esta hipótesis.

3.3 Ciclo replicativo

El modelo propuesto para el ciclo infectivo del reovirus aviar se puede observar en la Figura 8 y los detalles se comentan a continuación.

3.3.1. Entrada y desenvoltura de la cápside externa

La unión extracelular del reovirus aviar a la célula hospedadora está mediada por interacciones específicas entre la proteína de la cápside externa σC y algún receptor de la superficie celular (Shapouri *et al.*, 1996; Grande *et al.*, 2000). Se desconoce la identidad del receptor para los reovirus aviares, pero resultados no publicados de nuestro laboratorio sugieren que es una proteína de superficie no conjugada, debido a que la infección con reoviriones aviares purificados no se inhibe al tratar las células con glicosidasas, lipasas, EDTA o periodato sódico, pero sí con proteasas. Esta situación es diferente a la publicada para los reovirus de mamífero, que usan ácido siálico como receptor. El hecho de que los reovirus de mamífero no se unen a células aviares sugiere que los reovirus aviares y de mamífero usan diferentes receptores para unirse a la célula diana (Barton *et al.*, 2001). Por otra parte, el hecho de que los reovirus aviares sean capaces de unirse y de replicar, no sólo en células aviares, sino también en células de mamífero, sugiere que el receptor del reovirus aviar es una proteína ubicua de la superficie celular (Robertson y Wilcox, 1986).

Todos los virus deben atravesar la membrana para expresar su genoma. Así los virus envueltos son capaces de entrar en la célula fusionando sus envueltas lipídicas con la membrana citoplasmática (Kielan y Jungerwirth, 1990), mientras que los virus desnudos usan otros mecanismos alternativos como proteólisis y/o modificaciones conformacionales de proteínas específicas de la cápside. Para los virus que penetran en la célula por endocitosis mediada por receptor, estos cambios son promovidos por la acidificación vacuolar mediada por la ATPasas y/o por la actividad de las proteasas lisosomales (Carrasco, 1994). El procesamiento proteolítico de los viriones parentales, conocido como desenvoltura, desensamblaje o descapsidación, causa la eliminación total o parcial de las proteínas de la cápside externa, generando partículas virales capaces de atravesar la membrana lisosomal.

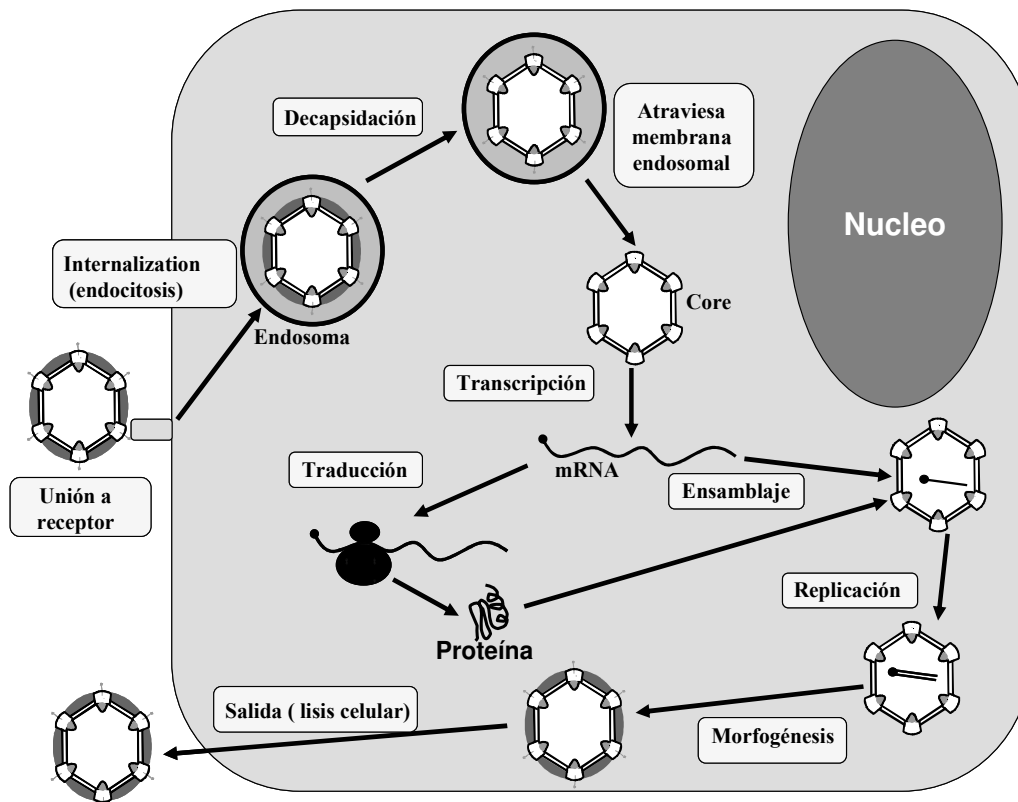


Figura 8. Modelo propuesto para la replicación del reovirus aviar.

La observación al microscopio electrónico de células infectadas a tiempos tempranos de infección, muestra que el virus penetra en fibroblastos embrionarios de pollo por endocitosis mediada por receptor (Figura 9). La desenvoltura, tiene lugar dentro de vacuolas intracelulares y depende en gran medida del procesamiento proteolítico de la proteína de la cápside μ BC, que genera los productos específicos δ y δ' (Figura 4) (Duncan, 1996). La acidificación de los endosomas y la actividad de las proteasas lisosomales son necesarias para la desenvoltura y la replicación intracelular del virus (Duncan, 1996). Sin embargo, el mecanismo por el cual los cores son capaces de atravesar la membrana de los endosomas y llegar al citoplasma celular sigue siendo uno de los pasos menos conocidos del ciclo replicativo de los reovirus aviares.

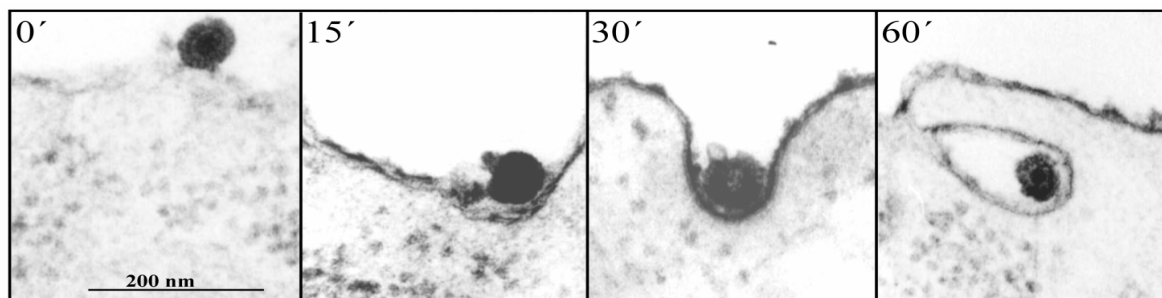


Figura 9. Observación al microscopio electrónico de la entrada del reovirus aviar (Benavente y Martínez-Costas, 2006).

Como ocurre con muchos otros virus, la infección de los reovirus aviares activa el programa apoptótico de células infectadas (Labrada *et al.*, 2002). La inducción de apoptosis tiene lugar a tiempos tempranos del ciclo replicativo viral y en ausencia de expresión de los genes reovirales. Agentes que bloquean la desensambladura del virus bloquean también la inducción de apoptosis, cuando están presentes desde el inicio de la infección viral, pero no cuando se añaden 3 horas más tarde, lo que sugiere que la apoptosis es inducida por las partículas subvirales que se originan en el interior de los lisosomas tras la desensambladura de los reoviriones parentales (Labrada *et al.*, 2002).

3.3.2. Expresión del genoma viral

La expresión del genoma reoviral comienza con la síntesis de los 10 mRNAs virales, un proceso catalizado por la RNA polimerasa viral, que usa la cadena negativa de los segmentos genómicos como molde para la síntesis del mRNA, un proceso que tiene lugar en el interior de la partícula viral (Martínez-Costas *et al.*, 1995). Se cree que el centro activo de la RNA polimerasa de los reovirus aviares radica en la proteína λB .

Se ha publicado que el reovirus aviar S1133 entra y se desensambla en células L de ratón crecidas en suspensión, pero que sólo se expresan 4 de los 10 segmentos genómicos, por lo que el virus no es capaz de replicar en este sistema heterólogo (Spandidos y Graham, 1976b). Estos resultados apoyaban la idea de que la transcripción de los segmentos genómicos de los reovirus está regulada temporalmente. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que los reovirus aviares sí son capaces de sintetizar todos los mRNAs virales, pero que éstos no se traducen bien en células de mamífero

(Benavente y Shatkin, 1988; Mallo *et al.*, 1991), lo que rebate la hipótesis de que la transcripción del genoma reoviral está regulada temporalmente.

Los mRNAs del reovirus aviar son idénticos a la cadena positiva de sus genomas, poseen un cap de tipo 1 en su extremo 5' y carecen de cola de poli A en su extremo 3' (Martínez-Costas *et al.*, 1995). Estos mRNAs se denominan igual que los segmentos genómicos que los expresan, pero utilizando letras minúsculas en vez de mayúsculas. El mRNA viral se sintetiza en el interior del core y adquiere el cap cuando sale a través de las torretas formadas por pentámeros de la guanililtransferasa viral (Zhang *et al.*, 2005b).

A pesar de que en las células infectadas hay niveles similares de los diferentes transcritos virales, los niveles intracelulares de las proteínas virales varían considerablemente. Así, μ BC, σ B y σ NS son las más abundantes, mientras que λ B, μ A y las tres proteínas codificadas por el gen S1 son las más escasas. Esto sugiere que la expresión del genoma viral está regulada fundamentalmente a nivel de traducción. Por otra parte, la infección con reovirus aviares induce una gran inhibición en la síntesis de proteínas celulares ("shut-off"), por mecanismos todavía desconocidos.

3.3.3. Morfogénesis y salida

Todos los miembros de la familia *Reoviridae* se ensamblan dentro del citoplasma, en unas inclusiones globulares densas al microscopio, denominadas inclusiones virales, factorías virales o viroplasmas. Estas estructuras que carecen de membrana y orgánulos celulares, contienen proteínas estructurales y no estructurales y también partículas virales parcial o completamente ensambladas (Rhim *et al.*, 1962; Silverstein y Schur, 1970; Fields *et al.*, 1971). La expresión individual de proteínas virales en células transfectadas reveló que μ NS es la única proteína del reovirus aviar capaz de formar inclusiones cuando se expresa en ausencia de otros factores virales. Esto, y el hecho de que las inclusiones formadas por μ NS en células transfectadas son muy similares en apariencia a las factorías virales de células infectadas, sugiere que μ NS es el factor viral mínimo necesario para formar los viroplasmas en células infectadas por el reovirus aviar (Tourís-Otero *et al.*, 2004a). El análisis mediante

microscopía de fluorescencia de células transfectadas que co-expresan μ NS y otras proteínas virales reveló que esta proteína recluta a la proteína no estructural σ NS y a la proteína del core λ A a las inclusiones virales. Estos resultados y la observación de que λ A y σ NS están presentes en las factorías virales de células infectadas sugieren que μ NS recluta de forma selectiva a estas dos proteínas a los viroplasmatas de células infectadas con reovirus aviar. Por contra, σ A y σ C no se incorporan a las inclusiones cuando se co-expresan con μ NS, indicando que el reclutamiento de proteínas virales a los viroplasmatas es específico, y que estas proteínas se incorporan a las factorías virales por un mecanismo independiente de μ NS (Tourís-Otero *et al.*, 2004b). La incorporación de otras proteínas virales a los viroplasmatas no se puede monitorizar por microscopía de fluorescencia, dado que el uso de anticuerpos no permite discriminar entre las proteínas que están libres y las que están asociadas a viroplasmatas. Para resolver este problema, en nuestro laboratorio se desarrolló un protocolo que combina experimentos de pulso y seguimiento, fraccionamiento celular e inmunoprecipitación de diferentes proteínas virales en células infectadas con reovirus aviar. Esta combinación de técnicas permitió discriminar entre las proteínas virales libres distribuidas de manera difusa por toda la célula, y las proteínas asociadas a las inclusiones. Los resultados obtenidos revelaron que la incorporación de proteínas virales a las factorías y a las partículas virales en formación, es un proceso controlado, secuencial y selectivo, y que la morfogénesis viral se lleva a cabo exclusivamente dentro de las factorías virales (Tourís-Otero *et al.*, 2004b). Se cree que la incorporación secuencial de las proteínas previene la encapsidación prematura de las proteínas de la cápside externa, lo que sellaría las partículas hijas antes del empaquetamiento del dsRNA genómico y generaría viriones vacíos no infectivos.

Aunque de momento no hay estudios sobre los mecanismos moleculares relacionados con la salida de las partículas virales de células infectadas, se cree que la proteína no estructural p10 juega un papel importante en la salida y diseminación de los reoviriones de la progenie *in vivo*, a que tiene actividad permeabilizante y es capaz de inducir la formación de sincitios cuando se expresa en células transfectadas. Estos resultados sugieren que p10 desempeña un papel clave en la actividad fusogénica de los reovirus aviares (Shmulevitz y Duncan, 2000; Bodelón *et al.*, 2002), actividad que podría ser importante para la replicación de los reovirus aviares en animales, ya que

facilitaría la diseminación y expansión del virus a células no infectadas sin quedar expuesto al sistema inmune del hospedador. La lisis celular también pudiera contribuir a la diseminación del virus, al igual que ocurre con los reovirus no fusogénicos.

4. FACTORÍAS VIRALES

La mayoría de los virus replican dentro de compartimentos celulares denominados viroplasmos, factorías virales o cuerpos de inclusión. Se cree que la principal función de estos compartimentos, que se mantienen unidos mediante interacciones entre proteínas, es concentrar los componentes virales necesarios para aumentar la eficacia de replicación del virus (Netherton *et al.*, 2007).

Las factorías que forman los virus citoplasmáticos son grandes inclusiones que normalmente se localizan en zonas pericentriolares próximas al centro organizador de los microtúbulos (MTOC, “microtubule organizing center”) y se parecen en gran medida a los agrosomas formados en las células en respuesta a la agregación de proteínas mal plegadas (Kopito, 2000; Wileman, 2006; 2007). Estos agregados forman inicialmente estructuras globulares pequeñas, que son llevadas hacia el MTOC mediante un transporte retrógrado a través de los microtúbulos mediado por dineína, para su posterior degradación por los proteasomas. Cuando la capacidad degradativa del proteasoma se excede, estos agregados convergen para formar agrosomas, los cuales precisan de los microtúbulos para formarse pero no para mantenerse. Estas estructuras densas localizadas en regiones perinucleares normalmente contienen proteínas ubiquitinadas, dineína, y/o inducen redistribución de vimentina. Los virus de DNA y replicación citoplasmática, como el virus vacunal, iridovirus y el virus de la fiebre porcina africana (“African swine fever virus”, ASFV), utilizan estas estructuras para organizar sus factorías virales, acumulando allí sus proteínas para realizar su replicación y morfogénesis.

Estudios recientes sugieren que las proteínas agregadas son eliminadas de los agrosomas a través de una ruta de degradación denominada autofagia. La activación de este proceso induce la formación de unas vesículas de doble membrana, de un diámetro de 500-1000 nm, denominadas autofagosomas, que se transportan a través de los

microtúbulos mediante un transporte retrógrado mediado por dineína hacia los agrosomas. Allí se encargan de reclutar agregados de proteínas, para conducirlos hacia los lisosomas, y así facilitar su eliminación. Se ha demostrado que algunos virus como picornavirus y coronavirus podrían beneficiarse del proceso de formación de autofagosomas para construir sus factorías virales (Wileman, 2007). Por otra parte, otros estudios sugieren que los virus herpes, adenovirus, parvovirus, papovavirus, y papiloma virus replican en lugares dentro del núcleo que están asociados con unas estructuras subnucleares especializadas en la contención y/o eliminación de agregados de proteínas, denominadas cuerpos PML/ND10, los cuales ejercen funciones relacionadas con la reparación del DNA, el metabolismo de la cromatina y regulación de la transcripción (Wileman, 2006; 2007).

Como se comentaba en el apartado de morfogénesis y salida, la replicación y ensamblaje de los miembros de la familia *Reoviridae* se lleva a cabo en unas estructuras citoplasmáticas carentes de membrana y densas al microscopio electrónico denominadas viroplasmas, factorías virales o cuerpos de inclusión viral (Estes., 2001; Nibert y Schiff., 2001; Roy., 2001). Se ha demostrado que la formación de viroplasmas corre a cargo de proteínas no estructurales específicas, como la μ NS de reovirus de mamífero, la NSP5 de rotavirus o la NS2 de bluetongue virus (Thomas *et al.*, 1990; Broering *et al.*, 2002; Mohan *et al.*, 2003). Numerosas observaciones sugieren que en el caso del género orthoreovirus la proteína no estructural μ NS es el factor viral mínimo necesario para formar las factorías virales, ya que es la única proteína capaz de formar este tipo de estructuras cuando se expresa de forma individual (Broering *et al.*, 2002; Tourís-Otero *et al.*, 2004a).

La mayoría de las cepas de reovirus de mamífero forman factorías con aspecto filamentoso, y solamente la cepa T3D^N produce factorías de aspecto globular (Parker *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el fenotipo filamentoso está relacionado con la proteína estructural del core μ 2. Esta proteína interacciona con los microtúbulos y con la proteína μ NS, y se piensa que estas interacciones son las responsables de anclar a las factorías virales a los microtúbulos, y contribuir así a su apariencia filamentosa (Broering *et al.*, 2002; Parker *et al.*, 2002). Por otra parte, la formación de factorías de reovirus de mamífero en células infectadas es dependiente de los microtúbulos, sin importar si son globulares o filamentosas. Esto se ha demostrado mediante el

tratamiento de células infectadas con nocodazol, un compuesto que despolimeriza los microtúbulos. La adición de este compuesto a células infectadas con reovirus de mamífero previene el que las inclusiones pequeñas de μ NS, originadas inicialmente a tiempos tempranos de infección, se fusionen para dar lugar a las inclusiones perinucleares grandes observadas a tiempos tardíos de infección (Parker *et al.*, 2002). Un efecto similar se observó con las inclusiones globulares formadas por la proteína μ NS de reovirus de mamífero en células transfectadas (Broering *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que, como ocurre en el caso de los agresomas, se requiere un transporte retrógrado a través de los microtúbulos para que las inclusiones virales pequeñas se fusionen en inclusiones perinucleares grandes cerca del MTOC (Broering *et al.*, 2002).

En el caso de los reovirus aviares el análisis mediante microscopía de fluorescencia de células infectadas realizados en nuestro laboratorio, demostró que los viroplasmas de los reovirus aviares poseen morfología globular y no están asociados a los microtúbulos. Además, al igual que ocurre con los reovirus de mamífero, μ NS es el factor viral mínimo necesario para formar los viroplasmas en células infectadas con el reovirus aviar (Tourís-Otero *et al.*, 2004a; 2004b). Como se comentaba en el apartado anterior, se ha demostrado que la morfogénesis viral se lleva a cabo exclusivamente dentro de las factorías virales de células infectadas con el reovirus aviar (Tourís-Otero *et al.*, 2004b).

5. LA PROTEÍNA μ NS DE LOS REOVIRUS

El gen M3 de los reovirus aviares tiene una secuencia nucleotídica de 1996 bp y una sola pauta abierta de lectura que codifica una proteína de 635 aminoácidos que corresponde a la proteína no estructural μ NS, con un peso molecular de 70,8 kDa (Varela y Benavente, 1994; Tourís-Otero *et al.*, 2004a; 2004b). La secuencia de μ NS del reovirus aviar difiere mucho de la de la μ NS de reovirus de mamífero, mostrando solamente un 28,3% de similitud en sus secuencias (Tourís-Otero *et al.*; 2004a). Así, si nos fijamos en el alineamiento realizado con el programa ClustalW observamos la existencia de numerosos huecos (Figura 10), que ilustran la diferencia de tamaño de ambas proteínas, siendo la de mamífero 86 aminoácidos más larga que la aviar. A pesar

de la variación existente entre las secuencias de las proteínas μ NS de diferentes tipos de reovirus, todas ellas presentan en el extremo carboxilo dos regiones con elevada probabilidad de formar estructuras "coiled-coil" (McCutcheon *et al.*, 1999; Tourís-Otero *et al.*, 2004a).

La proteína de μ NS de reovirus de mamífero ha sido ampliamente estudiada. Esta proteína es la encargada de reclutar a la proteína no estructural σ NS a las inclusiones, y dicha asociación requiere la presencia de los 13 primeros aminoácidos de μ NS. También parece que esa asociación es parcialmente dependiente de la capacidad de σ NS de unir ssRNA, ya que un mutante de σ NS sin capacidad para unir RNA no se asocia tan eficientemente con μ NS, y el tratamiento de coimmunoprecipitados de μ NS con RNasa libera gran cantidad de σ NS (Miller *et al.*, 2003). También se ha descrito que la proteína μ NS de reovirus de mamífero es la responsable de incorporar a las proteínas del core $\lambda 1$, $\lambda 2$ y $\sigma 2$ a las inclusiones virales (Broering *et al.*, 2004). Por otra parte, se han identificado dos isoformas de μ NS en células infectadas con reovirus de mamífero. La isoforma mayor de 80 kDa, denominada μ NS, es la que se genera cuando la traducción del mRNA m3 se inicia en el AUG más próximo al extremo 5', mientras que la isoforma menor de 75 kDa, denominada μ NSC, se origina por iniciación de la traducción en un codón AUG interno de dicho mRNA (Arnold *et al.*, 2008).

En un trabajo reciente (Broering *et al.*, 2005), mediante la expresión de versiones delecionadas de μ NS del reovirus de mamífero en células transfectadas se demostró que la fracción mínima de μ NS con capacidad de formar inclusiones abarca los aminoácidos 471 a 721 (250 residuos). Esta región contiene dos dominios con alta probabilidad de formar estructuras tipo "coiled-coil", unidos por una región intercoil y precedidos por una secuencia de 50 aminoácidos, y una cola C-terminal que sigue al segundo "coiled-coil". Por otro lado, en la región intercoil se identificaron residuos altamente conservados entre diferentes especies de reovirus que eran imprescindibles para la formación de inclusiones. Finalmente, se observó que la deleción del primer "coiled-coil" de la región 471 a 721 va acompañada de la pérdida de fenotipo, el cual se recupera si el primer "coiled-coil" es sustituido por la proteína GFP, pero no por el epitopo HA. Dado que GFP, pero no HA, tiende a dimerizar, los autores interpretaron que el primer "coiled-coil" se auto-asocia para formar oligómeros basales que controlan la eficiencia y la forma de las inclusiones.

Mediante el bloqueo de la replicación viral usando RNA interferente contra diferentes proteínas del reovirus de mamífero, y el desarrollo de un sistema de complementación para rescatar la infección utilizando μ NS, se ha demostrado que la proteína μ NS juega un papel clave en la morfogénesis viral, ya que es capaz de recuperar la infección viral de manera específica. Resultados inversos se obtuvieron cuando se intentó rescatar la infección viral usando mutantes de μ NS sin capacidad para formar inclusiones. Además, la isoforma μ NSC, que se cree que se genera por iniciación de la traducción en un codón AUG interno del mRNA m3 y que forma inclusiones en células transfectadas, tampoco era capaz de rescatar la infección, llegándose a la conclusión de que la formación de inclusiones por parte de μ NS es necesaria pero no suficiente para la replicación viral (Kobayashi *et al.*, 2006; Arnold *et al.*, 2008).

Recientemente, se ha descrito un sistema basado en la capacidad para formar inclusiones de la proteína μ NS de los reovirus de mamífero para detectar interacciones entre proteínas en el citoplasma de células de mamífero (Miller *et al.*, 2007) y que ha sido adaptado también para usarse en levaduras (Schmitz *et al.*, 2009). En dicho sistema la proteína objeto de estudio se fusiona con la zona N-terminal de la región mínima de μ NS con capacidad para formar inclusiones (residuos 471 a 721) para que la fusión genere inclusiones citoplasmáticas y atraiga a ellas al ligando de la proteína objeto de estudio. En el sistema de levaduras, estos autores demuestran que su sistema es superior al del doble híbrido en el número y tipo de interacciones detectadas, al menos con las proteínas ensayadas en dicho trabajo.

En el extremo carboxilo de la proteína μ NS de reovirus aviar existen dos regiones con alta probabilidad de formar estructuras tipo “*coiled-coil*”: una primera región que va desde el aminoácido 448 hasta el aminoácido 477; y una segunda región que comprende desde el aminoácido 539 hasta el aminoácido 605 (Figura 11).

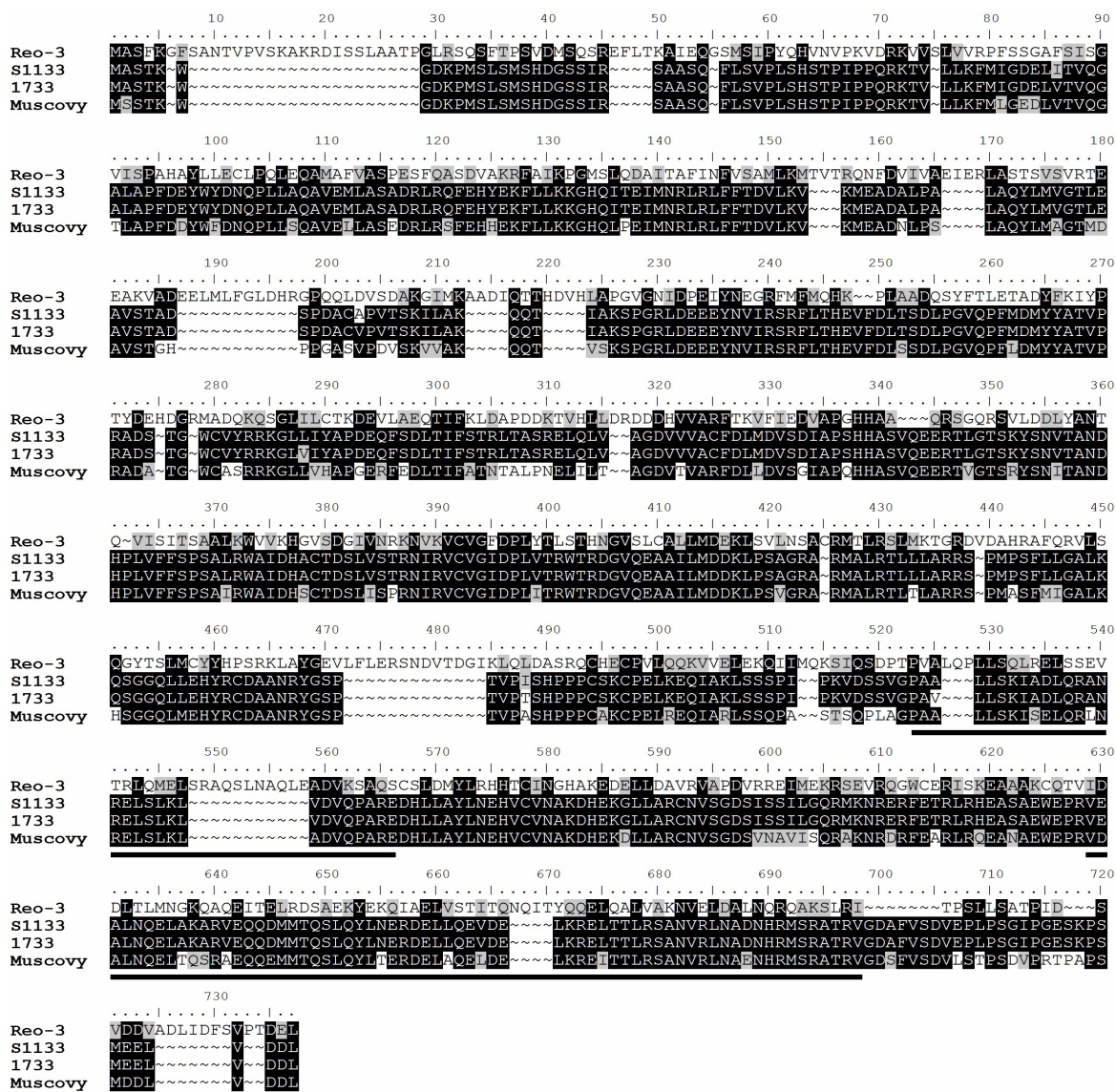


Figura 10. Comparación de la secuencia de μ NS de reovirus de mamífero (Reo-3) con la de las μ NS de los reovirus aviares 1733 y S1133 y del reovirus de pato muscovy. Están subrayadas las zonas con predicción de estructura “coiled-coil” para la proteína μ NS del reovirus aviar S1133. Para el alineamiento de secuencias se usó el ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

Este tipo de estructuras está implicada en la oligomerización de muchas proteínas, como la paramiosina (Landa *et al*, 1993; Muhlschlegel *et al*, 1993), la cadena pesada de la miosina (Yanagisawa *et al*, 1987; Dibb *et al*, 1989; Ketchum *et al*, 1990) o la proteína B parecida a kinesina (Mitsui *et al*, 1994).

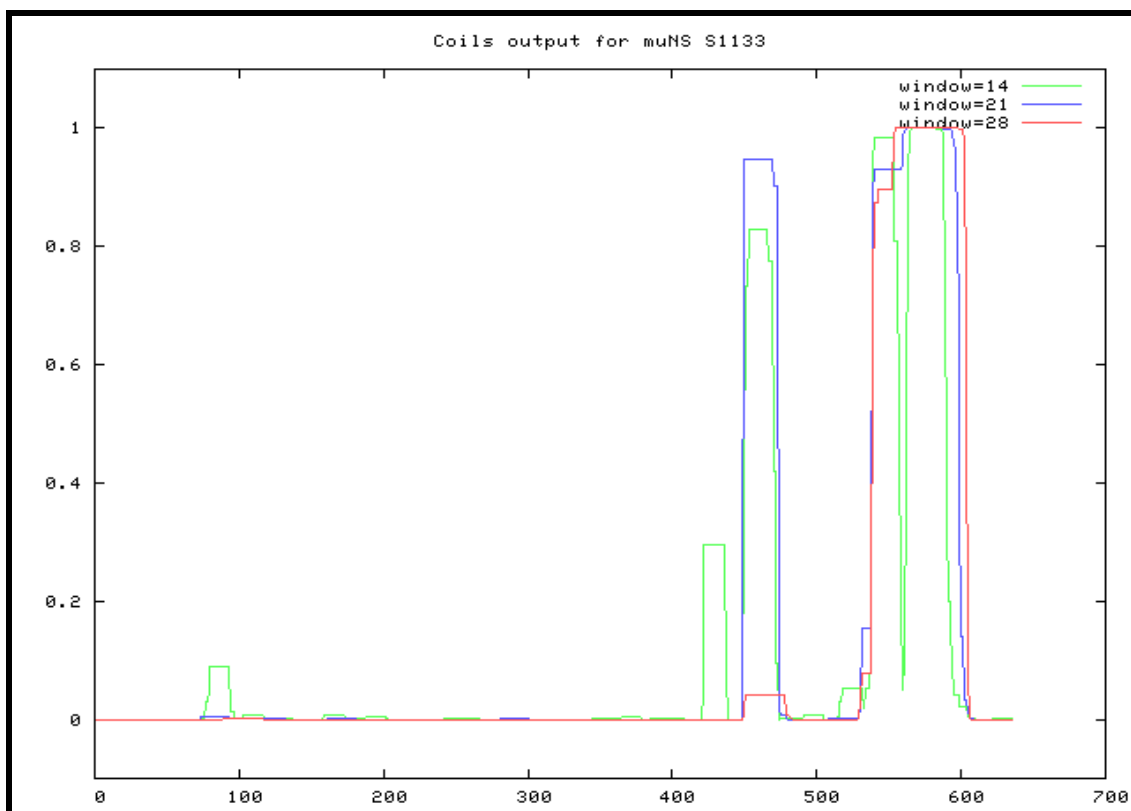


Figura 11. Análisis bioinformático de la proteína μ NS. Predicción de estructuras “coiled-coil” de la proteína μ NS de reovirus aviar S1133 hecha con el programa Coils (Lupas *et al.*, 1991; 1996).

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indicaron que en células infectadas μ NS sufre un procesamiento, cerca de su extremo N-terminal, para generar un fragmento N-terminal de 15 kDa denominado μ NSN y una proteína C-terminal de 55 kDa denominada μ NSC (Figura 12). Sin embargo, no se conoce la identidad de la proteasa que corta a μ NS, ni el sitio de corte y tampoco el posible significado biológico de este hecho, que está siendo investigado actualmente en nuestro laboratorio.

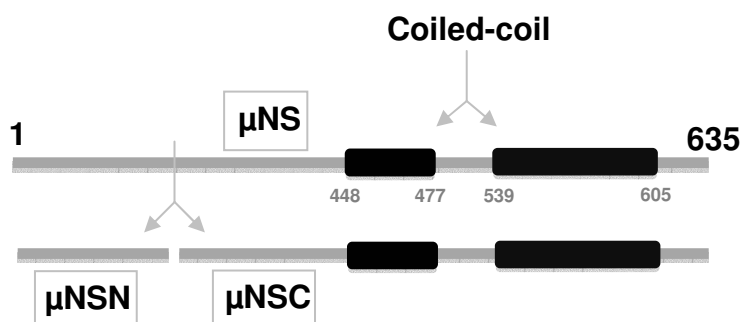


Figura 12. Esquema de μ NS y su procesamiento. La proteína μ NS posee dos regiones con probabilidad de formar “coiled-coil”, además se hidroliza para generar dos polipéptidos denominados μ NSN y μ NSC.

La investigación que he llevado a cabo para obtener el grado de Doctor se centró en la caracterización bioquímica de la proteína no estructural μ NS del reovirus aviar y en desarrollar un sistema de interacción y de purificación de proteínas usando la capacidad de esta proteína para formar inclusiones.

En la primera parte de la tesis y mediante ensayos de doble híbrido se demostró que la proteína interaccionaba consigo misma, lo que puso de manifiesto la naturaleza homo-oligomérica de la proteína μ NS. También demostramos que las inclusiones que forma la proteína expresada por un baculovirus recombinante en células de insecto están formadas fundamentalmente por μ NS. Los resultados también demostraron que la región mínima de μ NS con capacidad para formar inclusiones está compuesta por 4 dominios diferenciados: dos dominios “coiled-coil” (**Coil1 o C1**; **Coil2 o C2**), una región que los une (Intercoil o **IC**), y una Cola C-terminal que sigue al segundo “coiled-coil” (C-tail o **CT**). Se examinó la función que ejercen estos cuatro dominios en la formación de inclusiones.

En la segunda parte de la tesis decidimos comprobar si los diferentes dominios de μ NS son capaces de incorporarse a las inclusiones citoplasmáticas formadas por la proteína entera. Encontramos que el que mejor se incorpora es el dominio intercoil (**IC**), y demostramos que este dominio puede utilizarse para etiquetar proteínas y reclutarlas a las inclusiones citoplasmáticas que forma μ NS o sus diferentes versiones. Nuestros resultados revelaron que este etiquetado podría utilizarse para: i) secuestrar proteínas en las inclusiones; ii) purificar proteínas activas de forma simple; iii) detectar interacciones intracelulares proteína-proteína en el citoplasma de las células. Finalmente, mediante la generación de versiones de μ NS con capacidad para formar inclusiones nucleares, fuimos capaces de adaptar el sistema para detectar interacciones entre proteínas en el núcleo celular.

II.OBJETIVOS

Objetivos

En este trabajo hemos realizado una caracterización de la proteína no estructural μ NS del reovirus aviar S1133 y hemos buscado posibles aplicaciones biotecnológicas basadas en su actividad. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar y caracterizar la formación de inclusiones citoplasmáticas por parte de μ NS, y buscar, identificar y determinar la función de dominios de μ NS implicados en la generación de inclusiones.
2. Buscar e intentar desarrollar posibles aplicaciones biotecnológicas basadas en la capacidad formadora de inclusiones de la proteína μ NS.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Células eucariotas

Fibroblastos embrionarios de pollo (CEF): son células fibroblásticas primarias que se obtienen de embriones de pollo, tal y como se describe en Métodos.

COS-7: es una línea celular estable procedente de riñón de mono verde africano, que expresa el antígeno T del virus SV-40.

Sf-9: es una línea celular estable procedente del ovario de la oruga de la acelga (*Spodoptera frugiperda*), obtenida de Invitrogen.

1.2. Virus

1.2.1. Reovirus aviar

S1133 es una cepa poco patogénica de reovirus aviar que se ha utilizado mucho para generar vacunas (van der Heide y Kalbac, 1975).

1.2.2. Baculovirus

Bac-WT (wild-tipe) es una cepa de baculovirus que ha sido desprovista de los genes de polihedrina y P10 y que no expresa proteínas foráneas.

Bac- μ NS es un baculovirus recombinante que expresa la proteína μ NS del reovirus aviar S1133.

Bac- μ NS-Mi es un baculovirus recombinante que expresa la región que comprende los aminoácidos 448 a 635 de la proteína μ NS del reovirus aviar S1133.

Bac-GFP- μ NS(448-605) es un baculovirus recombinante que expresa a la EGFP fusionada a la región que comprende los aminoácidos 448 a 605 de la proteína μ NS del reovirus aviar S1133. Se denomina GFP-C1-IC-C2 en resultados.

Bac-CA-C- μ NS(448-605) es un baculovirus recombinante que expresa el dominio de dimerización C-terminal (CA-C) de la proteína CA de la cápside del virus VIH fusionada a la región que comprende los aminoácidos 448 a 605 de la proteína μ NS del reovirus aviar S1133. Se denomina CA-C-C1-IC-C2 en resultados.

Bac-GFP es un baculovirus recombinante que expresa la proteína EGFP.

Bac-GFP-Xa- μ NS(477-542) es un baculovirus recombinante que expresa EGFP fusionada a la región que comprende los aminoácidos 477 a 542 de la proteína μ NS del reovirus aviar S1133, y que incluye una secuencia diana para la proteasa factor Xa entre ambos dominios proteicos . Se denomina GFP*IC en resultados.

Bac-Luciferasa es un baculovirus recombinante que expresa la proteína luciferasa de *Photinus pyralis*. Se denomina Luc en resultados.

Bac-Luciferasa-Intercoil es un baculovirus recombinante que expresa la proteína luciferasa de *Photinus pyralis* fusionada a la región que comprende los aminoácidos 477 a 542 de la proteína μ NS del reovirus aviar S1133. Se denomina Luc-IC en resultados.

Bac-GFP- μ NS es un baculovirus recombinante que expresa la proteína μ NS del reovirus aviar S1133 fusionada a la proteína EGFP en su extremo amino.

Bac-GFP- μ NS(448-635) es un baculovirus recombinante que expresa la región que comprende los aminoácidos 448 a 635 de la proteína μ NS del reovirus aviar S1133 fusionada a la proteína EGFP en su extremo amino. Se denomina GFP- μ NS-Mi en resultados.

1.3. Células procariotas

DH5- α : Cepa bacteriana de *E. coli* utilizada para el crecimiento y purificación de plásmidos cuyo genotipo es: *supE44*, Δ *lacU169*(ϕ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* (Hanahan, 1983).

DH10Bac: Cepa bacteriana de *E. coli* usada para crear genomas de baculovirus recombinantes cuyo genotipo es: F-*mcrA*, D(*mrrhsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ*DM15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, Δ (*ara*, 27*leu*)7697, *galU*, *galK*, λ -*rpsL*, *nupG*/bMON14272 /pMON7124 (Invitrogen, Barcelona, España).

XL1-Blue: Cepa bacteriana de *E. coli* usada para el crecimiento y purificación de plásmidos cuyo genotipo es: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*[F'*proAB lacIqZ* Δ M15 Tn10 (Tetr)] (Stratagene, La Jolla, California).

1.4. Plásmidos parentales

pCDNA3.1/Zeo (Invitrogen, Barcelona, España): vector de expresión eucariota que permite la expresión transitoria de genes clonados bajo el promotor temprano de citomegalovirus.

pFastBacI (Invitrogen, Barcelona, España): vector de expresión del sistema Bac-to-Bac utilizado para generar baculovirus recombinantes.

pEGFP-N1 (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia): vector de expresión eucariota para expresar proteínas fusionadas a la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) en su extremo amino, bajo el promotor temprano de citomegalovirus.

pEGFP-C1 (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia): vector de expresión eucariota para expresar proteínas fusionadas a la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) en su extremo carboxilo, bajo el promotor temprano de citomegalovirus.

pCINeo (Promega, Madrid, España): vector de expresión eucariota que permite la expresión transitoria de genes clonados bajo el promotor temprano de citomegalovirus.

pVP16 (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia): vector de expresión eucariota para expresar proteínas fusionadas en su extremo amino a una proteína del virus herpes (VP16) que actúa como un activador transcripcional, y que también contiene la secuencia de localización nuclear (NLS) del antígeno T del SV40. Usa el promotor temprano del SV40.

pM (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia): vector de expresión eucariota para expresar proteínas fusionadas en su extremo amino a un dominio de unión a DNA (GAL4) que contiene acoplada la NLS del antígeno T del SV40. El promotor es el del SV40.

1.5. Plásmidos recombinantes

pCIneo-μNS: Contiene el ORF del gen M3 de la cepa S1133 de reovirus aviar (Tourís-Otero *et al.*, 2004b).

pEGFP-C1-μNS: Contiene el ORF del gen M3 de la cepa S1133 de reovirus aviar, (Tourís-Otero *et al.*, 2004b).

pCMV-wtAgT: Cedido por el Dr. J.B. Zalvide (Departamento de Fisiología, Universidad de Santiago de Compostela). Contiene el ORF del gen de la versión larga del antígeno T, bajo el promotor temprano de citomegalovirus.

pCMV-wtp53: Cedido por el Dr. J.B. Zalvide (Departamento de Fisiología, Universidad de Santiago de Compostela). Contiene el ORF del gen de la proteína p53 humana bajo el promotor temprano de citomegalovirus.

1.6. Anticuerpos

1.6.1 Anticuerpos primarios

-En nuestro laboratorio se habían generado anticuerpos policlonales contra la proteína μNS (Tourís-Otero *et al.*, 2004a), mediante la inmunización de conejos con la proteína

μ NS desnaturalizada y extraída de un gel de SDS-PAGE. Se usaron en Weterblot a diluciones entre 1:5000 y 1:10000 y en inmunofluorescencia a diluciones entre 1:1000 y 1:5000.

-Anticuerpo monoclonal contra la proteína fluorescente verde (GFP) de *Aequorea victoria* (Roche, Barcelona, España). Se usó 1:1000 en Weterblot.

-Anticuerpo policlonal de conejo específico contra el epitopo de la hemaglutinina del virus influenza (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se usó 1:1000 en inmunofluorescencia.

-Anticuerpo monoclonal contra p53 (clon PAB40) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se usó 1:200 en inmunofluorescencia.

-Anticuerpo monoclonal contra el antígeno T del SV40 (clon PAb101) (BD biosciences, Madrid, España). Se usó 1:1000 en inmunofluorescencia.

-Anticuerpo monoclonal contra α -tubulina (clon DM1A) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se usó 1:1000 en inmunofluorescencia.

-Anticuerpo monoclonal contra γ -tubulina (clon GTU-88) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se usó 1:1000 en inmunofluorescencia.

-Anticuerpo monoclonal contra vimentina (clon VIM13.2) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se usó 1:1000 en inmunofluorescencia.

-Anticuerpo monoclonal contra conjugados de ubiquitina (clon FK2) (Biomol Internacional L.P., Exeter, Reino Unido). Se usó 1:1000 en inmunofluorescencia.

-Anticuerpo policlonal de cabra específico contra luciferasa (*Photinus pyralis*) (Promega, Madrid, España). Se usó 1:500 en inmunofluorescencia y 1:2000 en Weterblot.

1.6.2 Anticuerpos secundarios

-Anticuerpos de cabra contra IgG de conejo y de ratón o anticuerpos de conejo contra IgG de cabra conjugados con peroxidasa para la detección por Weterblot (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

- Anticuerpos de cabra contra IgG de conejo y de ratón o anticuerpos de conejo contra IgG de cabra conjugados con diversos fluorocromos: CY3 (Sigma, Madrid, España), Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Barcelona, España), para la detección por microscopía de fluorescencia (Wang y Taylor, 1989; Herman y Lemasters, 1993). Todos ellos se utilizaron en diluciones que variaron entre 1:1000 y 1:20000.

2. MATERIAL NO BIOLÓGICO

2.1. Medios de cultivo

Para el crecimiento de fibroblastos de embrión de pollo se utilizó medio 199 con sales de Earle (Invitrogen, Barcelona, España), suplementado con suero fetal de ternera (Invitrogen, Barcelona, España) al 2%, 5% o 10%, 2 mM de L-Glutamina (Invitrogen, Barcelona, España), 100 U/ml de penicilina (Invitrogen, Barcelona, España) y 100 µg/ml de estreptomicina (Invitrogen, Barcelona, España). El pH se ajustó a 7,2 y se suplementó con 10% de caldo de triptosa fosfato (TPB) (Invitrogen, Barcelona, España) y 0,25 µg/ml de fungizona (Invitrogen, Barcelona, España).

Para el cultivo de la línea celular COS-7 se utilizó medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) que contenía 3,7 g/L de NaHCO₃, 4,5 g/L de glucosa, y piruvato (Invitrogen, Barcelona, España). Al medio se le añadió suero bovino fetal (FBS) al 2,5 y 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2 mM de L-glutamina.

Como medio para las transfecciones de DNA plasmídico se utilizaron los medios 199 y D-MEM suplementados exclusivamente con 2 mM de L-glutamina.

Para el cultivo de SF9 se utilizó el medio SF900II SFM (Invitrogen, Barcelona, España) suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

El crecimiento de *E. coli* se realizó en medio de Luria-Bertani (LB) conteniendo glucosa al 0,2%. Para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos, el medio se suplementó con los antibióticos ampicilina (100 µg/ml) (Sigma, Madrid, España), gentamicina (7 µg/ml) (Sigma, Madrid, España), tetraciclina (10 µg/ml) (Sigma, Madrid, España) o kanamicina (50 µg/ml) (Sigma, Madrid, España), según el método de selección para cada plásmido. Los cultivos de colonias en medio sólido se realizaron en el mismo medio conteniendo 1,5% bacto-agar (Sigma, Madrid, España) y antibióticos a las concentraciones indicadas anteriormente. La composición de estos

medios se describe de forma detallada en el manual de protocolos de Sambrook et al. (1989).

2.2. Disoluciones y tampones

-PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂PO₄ y 1,5 mM KH₂PO₄.

-PBST: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂PO₄; 1,5 mM KH₂PO₄ y 0,05% Tween-20.

-PBST-Leche: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂PO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 0,05% Tween-20 y 5% de leche desnatada.

-PBS-BSA: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂PO₄; 1,5 mM KH₂PO₄ y 2% BSA.

-PBS-BSA-Tritón: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂PO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 2% BSA y 0,5% Triton-X100.

-PBS-Paraformaldehido: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂PO₄; 1,5 mM KH₂PO₄ y 4% paraformaldehido despolimerizado.

-Medio de montaje: 6 g glicerol; 2,4 g mowiol; 6 ml H₂O y 12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5).

-Tampón de electroforesis para SDS-PAGE 1X (Tris-glicina-SDS): 25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 192 mM glicina y 0,1 % SDS.

-Tampón de muestra para DNA (6X): 0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol y 30% glicerol.

-Tampón de muestra de Laemmli: 60 mM Tris-HCl (pH 6,8); 2% SDS; 5% β-mercaptoetanol; 10% glicerol y 0,024% azul de bromofenol.

-Tampón de transferencia: 25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 192 mM glicina y 20% metanol.

-Tampón Tris-EDTA (TE): 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) y 1 mM EDTA.

-Tampón Tris-acetato-EDTA (TAE): 0,004 M Tris-acetato y 0,001 M EDTA.

-Tampón RIPA: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0,5% desoxicolato sódico y 0,1% SDS.

-Tampón hipotónico: 10 mM Hepes pH 7,9; 10 mM KCl; 5 mM MgCl₂.

-Tampón TSS: 10% PEG 4000; 5% DMSO; 25 mM MgCl₂; 10% glicerol y 80% LB

-Tampón de luciferasa: 220 mM K₂HPO₄ y 30 mM KH₂PO₄.

-Mowiol (Calbiochem, Madrid, España): empleado para preparar el medio de montaje.

-**Nocodazol** (Sigma-Aldrich, Madrid, España): preparado a 4 mg/ml en DMSO.

-**DAPI**: preparado a 100 µg/ml en agua estéril y esterilizado a través de un filtro de 0,22 µm.

3. MÉTODOS

3.1. Manipulación de células bacterianas

3.1.1. Crecimiento y mantenimiento de bacterias

Las bacterias se crecieron con agitación a 37°C en medio LB-0,2% glucosa con ampicilina (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), gentamicina (7 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), tetraciclina (10Ug/ml) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) o kanamicina (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) según el método de selección para cada plásmido. Se conservaron congeladas a -80°C en el mismo medio suplementado con 20% de glicerol.

3.1.2. Obtención de bacterias competentes y transformación

La cepa bacteriana correspondiente se creció en medio LB-0,2% glucosa a 37°C durante toda la noche y el cultivo se diluyó 1/100 en el mismo medio precalentado y las bacterias se crecieron hasta alcanzar un valor de absorbancia a 600 nm de 0,3. A continuación se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min a 4°C (Beckman GPR Centrifuge). Seguidamente se resuspendieron en 1/10 de su volumen original en tampón de transformación TSS previamente enfriado en hielo (Chung *et al.*, 1989). Las células se guardaron congeladas a -80°C hasta su uso.

Para su transformación, las bacterias competentes se descongelaron en hielo y se mezcló una alícuota de 100 µl con el DNA transformante (1-10 ng). Después de incubar en hielo durante 30 min, se realizó un choque térmico a 42°C durante 1 min. Tras mantenerlas de nuevo en hielo durante 2 min, se añadió 1 ml de LB-glucosa (0,2%) y se incubaron a 37°C durante 1 h con agitación. Por último se recogieron por centrifugación

y se esparcieron en una placa de LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente.

3.2. Manipulación de ácidos nucleicos

3.2.1. Purificación de DNA plasmídico

La purificación de DNA a pequeña escala, para el análisis de transformantes, se realizó usando el sistema DNA WizardTM Minipreps (Promega, Madrid, España) a partir de 3 ml de cultivo bacteriano. Para la obtención de DNA a mayor escala se aisló el plásmido a partir de 100 ml de cultivo bacteriano usando el sistema PureYieldTM Plasmid Midiprep System (Promega, Madrid, España), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones estándar se llevaron a cabo manteniendo constantes las concentraciones de los reactivos y los ciclos de amplificación, a excepción de la temperatura de hibridación y el tiempo de extensión, que variaba en función de los oligonucleótidos empleados y del tamaño del DNA utilizado como molde para iniciar la reacción. Generalmente se utilizó como programa de amplificación: 1 ciclo (2 min. a 95°C), 30 ciclos (1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C) y un ciclo final de 10 min a 72°C. En todos los casos la reacción de amplificación contenía 5 unidades de *Taq* polimerasa (EcoTaq (Grupo-3, Vigo, España) o *pfu*-polimerasa, (Promega, Madrid, España) y 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μM de cada cebador y 1 ng de plásmido.

3.2.3. Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Todas las reacciones se realizaron con el kit SuperScriptTM One Step RT-PCR System con Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Barcelona, España) que incluye tampón de reacción 2X (conteniendo 0,4 mM de cada dNTP y 3,2 mM MgSO₄). Las reacciones se llevaron a cabo manteniendo constantes las concentraciones de los

reactivos y los ciclos de amplificación, a excepción de la temperatura de hibridación, que varió dependiendo del oligonucleótido empleado para iniciar cada reacción.

Generalmente se utilizó como programa de transcripción reversa: 1 ciclo (5 min a 100°C) donde están presentes sólo el RNA y los cebadores, 1 ciclo (5 min a 0°C), 1 ciclo (30 min a 55°C) donde se añade previamente la mezcla de reacción 2X y las enzimas.

Para la amplificación del DNA se utilizaron las siguientes condiciones: 1 ciclo (2 min a 94°C), 29 ciclos (1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 68°C por cada kb) y un ciclo final de 10 min a 68°C. En todos los casos la reacción de amplificación se realizó con 1U de SuperScript™ III/Platinum® Taq Mix, 1X de tampón de reacción e incluyó 0,4 µM de cada cebador y 1 µg de RNA.

3.2.4. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA procedentes de reacciones de PCR o de digestiones con enzimas de restricción se separaron mediante electroforesis en geles de 0,8-2% de agarosa en TAE 1X en presencia de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989). La banda de DNA se cortó del gel con una cuchilla, se transfirió a un microtubo y el DNA se purificó mediante el kit comercial "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.2.5. Corte y unión de fragmentos de DNA

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción (Promega, Madrid, España) se llevaron a cabo según las instrucciones del proveedor, en los tampones suministrados y a la temperatura óptima para cada caso. Las reacciones de ligación se realizaron a temperatura ambiente con la DNA ligasa del fago T4 (Promega, Madrid, España) con una relación molar entre vector e inserto de 1:5.

3.2.6. Mutaciones puntuales del DNA

Para obtener los plásmidos recombinantes que expresan los mutantes puntuales μ NS-H487Q y μ NS-C489S se utilizó el sistema QuikChangeTM para mutagénesis dirigidas de Stratagene (La Jolla, California) siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante. Se usó como molde el plásmido pCINeo- μ NS (Tourís-Otero *et al.*, 2004b) y cebadores específicos:

Para la obtención de pCINeo- μ NS-H487Q se utilizó como cebador positivo:

5'- GTTGGCTTATCTCAATGAACAGGTGTGTGTAAATGCTAAAGATC-3'

y como cebador negativo:

5'-GATCTTTAGCATTACACACACCTGTTTCATTGAGATAAGCCAAC-3'

Para la obtención de pCINeo- μ NS-C489S se utilizó como cebador positivo:

5'-GTTGGCTTATCTCAATGAACACGTGAGTGTAATGCTAAAGATC-3'

y como cebador negativo:

5'-GATCTTTAGCATTACACTCACGTGTTTCATTGAGATAAGC CAA C-3'.

Todas las mutaciones generadas se comprobaron por análisis de restricción y por secuenciación directa de los plásmidos (Sistemas Genómicos SL, Valencia, España).

3.2.7. Construcciones de plásmidos recombinantes

3.2.7.1. Generación de deleciones de μ NS

Para generar los plásmidos que expresan deleciones de μ NS, los codones de iniciación y de terminación y las dianas de enzimas de restricción se introdujeron en diferentes posiciones del gen M3 del reovirus aviar S1133 mediante amplificación por PCR usando como molde pGEMT-M3 (Tourís-Otero *et al.*, 2004b) y los cebadores mostrados en la Tabla 1. Los productos de PCR y los plásmidos pCINeo o pCDNA3.1/Zeo se cortaron con las enzimas EcoRI y XbaI y posteriormente se ligaron.

Todas las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación (Sistemas Genómicos SL, Valencia, España) y Western-blot, usando anticuerpos contra μ NS (datos no mostrados).

Tabla 1. Construcción de plásmidos que expresan delecciones de μ NS

| Construcciones ^a | Cebadores ^b (5'-3') | Proteína ^c | Tamaño(kDa) ^d |
|---------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------|
| pCINeo -M3(1-154) | F-GCGGAATTCATC <u>ATGG</u> CGTCAACCAAGTGG R-GCGTCTAGATTAATCGGGGGAATCAGCGGTGG | μ NS(1-154) | 17,2 |
| pCINeo -M3(1-380) | F-GCGGAATTCATC <u>ATGG</u> CGTCAACCAAGTGG R-GCGTCTAGATTA <u>TGG</u> AGACCGTCTAGCGAGAAG | μ NS(1-380) | 42,3 |
| pCINeo -M3(1-448) | F-GCG <u>GAATTC</u> ATC <u>ATGG</u> CGTCAACCAAGTGG R-GCGTCTAGATTA <u>TGG</u> ACCAACGGACGAATCG | μ NS(1-448) | 49,4 |
| pCINeo -M3(1-477) | F-GCGGAATTCATC <u>ATGG</u> CGTCAACCAAG TGG R-GCGTCTAGATTA <u>TTCC</u> CGAGCAGGTTGAACATC | μ NS(1-477) | 52,7 |
| pCINeo -M3(1-542) | F-GCG <u>GAATTC</u> AT <u>ATGG</u> CGTCAACCAAGTGG R-GCGTCTAGATTA <u>ACG</u> TTCCACACGGGGTTCAC | μ NS(1-542) | 60,2 |
| pCINeo -M3(1-605) | F-GCGGAA <u>TTCATC</u> <u>ATGG</u> CGTCAACCAAGTGG R-GCGTCTAGATTA <u>GAC</u> ACGTGTCGACGACTCATC | μ NS(1-605) | 67,7 |
| pCINeo-M3(11-635) | F-GCGGAATTCACGATGTCGCTCTCAATGTCTC R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(11-635) | 69,7 |
| pCINeo-M3(52-635) | F-GCGGAATTCATC <u>ATG</u> ATTGGTGACGAAGTGG R-GCGTCT <u>AGATCA</u> CAGATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(52-635) | 65,3 |
| pCINeo-M3(84-635) | F-GCGGAATTCGAGATGCTCGCTCTGC R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(84-635) | 61,7 |
| pCINeo-M3(112-635) | F-GCGGAA <u>TTCG</u> AGATC <u>ATGA</u> ACAGGTTACGT R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(112-635) | 58,3 |
| pCINeo-M3(127-635) | F-GCGGAA <u>TTC</u> AAGATGGAAGCTGACGCTTTACC R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(127-635) | 56,4 |
| pCINeo-M3(140-635) | F-GCG <u>GAATTC</u> GTGATGTTGGAACCTTGGAG R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(140-635) | 55,0 |
| pCINeo-M3(208-635) | F-GCGGAATTCGTTATGACATGTACTACGCCA R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(208-635) | 47,6 |
| pCINeo-M3(271-635) | F-GCGGAATTCATC <u>ATG</u> GACGTCTCTGACATTGC R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(271-635) | 40,5 |
| pCINeo-M3(381-635) | F-GCGGAATTCATC <u>ATG</u> CCATCCTTCTACTCGGTG R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(381-635) | 28,4 |
| pCINeo-M3(421-635) | F-GCGGAATTCATC <u>ATG</u> TGCTCA AAGTGTCTGAG C R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(421-635) | 24,3 |
| pCINeo-M3(448-635) ¹ | F-GCGGAATTCATC <u>ATG</u> CCAGCCGTACTGCTGTCTA R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(448-635) ¹ | 21,5 |
| pCDNA3.1/Zeo-M3(477-635) | F-GCGGAATTCATC <u>ATG</u> GAAAGATCACTTGTGGCTTATC R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(477-635) | 18,3 |
| pCDNA3.1/Zeo-M3(539-635) | F-GCGGAATTCATC <u>ATG</u> GCGGTGTGGAAGCGTTAAACCAAG R-GCGTCTAGATCA <u>CAG</u> ATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(539-635) | 11,0 |
| pCDNA3.1/Zeo-M3(448-605) | F-GCGGAATTCATC <u>ATG</u> CCAGCCGTACTGCTGTCTA R-GCGTCTAGATTA <u>GAC</u> ACGTGTCGACGACTCATC | μ NS(448-605) | 18,3 |
| pCDNA3.1/Zeo-M3(477-605) | F-GCGGAATTCATC <u>ATG</u> GAAAGATCACTTGTGGCTTATC R-GCGTCTAGATTA <u>GAC</u> ACGTGTCGACGACTCATC | μ NS(477-605) | 15,2 |

^a Cada construcción se diseñó para contener la porción del gen M3 deseada, que incluye los residuos de μ NS indicados.

^b Para cada construcción, al cebador negativo (R) se le añadió un codón de stop, lo que está doblemente subrayado, y al cebador positivo un codón de iniciación, que está doblemente subrayado. Las dianas de EcoRI o XbaI incorporadas en el extremo 5' de los cebadores están subrayadas.

^c Cada construcción se diseñó para expresar una región de μ NS que comprende los aminoácidos indicados.

^d Tamaño esperado para las proteínas expresadas.

¹ Esta construcción se denomina μ NS-Mi en resultados.

3.2.7.2. Generación de quimeras de μ NS (1)

i) Fusiones a GFP

Los plásmidos pEGFP-C1 y pEGFP-N1 (BD Biosciences, Madrid, España) se utilizaron para expresar la proteína EGFP de *Aequorea victoria* fusionada al extremo amino o carboxilo de diferentes regiones de μ NS o μ NS-Mi. Mediante PCR y cebadores específicos se introdujeron dianas para EcoRI y BamHI en la región del gen M3 que se quería amplificar. Las PCRs se realizaron usando como molde pGEMT-M3 (Tourís-Otero *et al.*, 2004b) y los cebadores mostrados en la Tabla 2. Los productos de PCR y el plásmido pEGFP-C1 se cortaron con EcoRI y BamHI y posteriormente se ligaron.

Todas las construcciones se verificaron por secuenciación (Sistemas Genómicos SL, Valencia, España) y Western-blot, usando anticuerpos contra μ NS y GFP (datos no mostrados).

Tabla 2. Construcción de quimeras de μ NS con GFP.

| Construcción ^a | Cebadores ^b (5'-3') | Proteína ^c | Tamaño(kDa) ^d |
|-----------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------|
| pEGFP-C1-M3(1-635) | F-GCGGAATTCTATCATGGCGTCAACCAAGTGG R-GCGGGATCCTCAGATCATCCACCAATTCTTC | GFP/ μ NS(1-635) | 99,0 |
| pEGFP-C1-M3(1-605) | F-GCGGAATTCTATCATGGCGTCAACCAAGTGG R- GCGGGATCCTTAGACACGTGTCGACGACTCATC | GFP/ μ NS(1-605) | 95,9 |
| pEGFP-C1-M3(1-542) | F-GCGGAATTCTATCATGGCGTCAACCAAGTGG R-GCGGGATCCTTACGCTTCCACACGGGGTCCCAC | GFP/ μ NS(1-542) | 88,5 |
| pEGFP-C1-M3(1-477) | F-GCGGAATTCTATCATGGCGTCAACCAAGTGG R-GCGGGATCCTTATTTCCGAGCAGGTTGAACATC | GFP/ μ NS(1-477) | 81,0 |
| pEGFP-C1-M3(1-448) | F-GCGGAATTCTATCATGGCGTCAACCAAGTGG R-GCGGGATCCTTATGGACCAACGGACGAATCG | GFP/ μ NS(1-448) | 77,8 |
| pEGFP-C1-M3(1-380) | F-GCGGAATTCTATCATGGCGTCAACCAAGTGG R-GCGGGATCCTTATGGAGACCGTCTAGCGAGAAG | GFP/ μ NS(1-380) | 70,6 |
| pEGFP-C1-M3(1-154) | F-GCGGAATTCTATCATGGCGTCAACCAAGTGG R-GCGGGATCCTTATCGGGGGAATCAGCGGTGG | GFP/ μ NS(1-154) | 45,4 |
| pEGFP-C1-M3(448-635) ¹ | F-GCGGAATTCTCCAGCCGTACTGCTGC R-GCGGGATCCTCAGATCATCCACCAATTCTTC | GFP/ μ NS(448-635) ¹ | 49,5 |
| pEGFP-C1-M3(477-635) ² | F-GCGGAATTCTGAAGATCACTTG TTGGCTTATC R-GCGGGATCCTCAGATCATCCACCAATTCTTC | GFP/ μ NS(477-635) ² | 46,3 |
| pEGFP-C1-M3(539-635) | F-GCGGAATTCTCGTGTGAAGCGTTAAACCAAG R-GCGGGATCCTCAGATCATCCACCAATTCTTC | GFP/ μ NS(539-635) | 39,1 |
| pEGFP-C1-M3(605-635) | F-GCGGAATTCTGTCGGAGACGCCTTCGTCAGTG R-GCGGGATCCTCAGATCATCCACCAATTCTTC | GFP/ μ NS(605-635) | 31,3 |
| pEGFP-C1-M3(448-605) ³ | F-GCGGAATTCTCCAGCCGTACTGCTGTC R-GCGGGATCCTTAGACACGTGTCGACGACTCATC | GFP/ μ NS(448-605) ³ | 46,4 |
| pEGFP-C1-M3(477-605) | F-GCGGAATTCTGAAGATCACTTG TTGGCTTATC R-GCGGGATCCTTAGACACGTGTCGACGACTCATC | GFP/ μ NS(477-605) | 43,2 |
| pEGFP-C1-M3(448-542) | F-GCGGAATTCTCCAGCCGTACTGCTGTC R-GCGGGATCCTTACGCTTCCACACGGGGTCCCAC | GFP/ μ NS(448-542) | 38,7 |
| pEGFP-C1-M3(448-477) | F-GCGGAATTCTCCAGCCGTACTGCTGTC R-GCGGGATCCTTATTTCCGAGCAGGTTGAACATC | GFP/ μ NS(448-477) | 31,3 |
| pEGFP-C1-M3(477-542) ⁴ | F-GCGGAATTCTGAAGATCACTTG TTGGCTTATC R-GCGGGATCCTTACGCTTCCACACGGGGTCCCAC | GFP/ μ NS(477-542) ⁴ | 35,7 |
| pEGFP-C1-M3(539-605) | F-GCGGAATTCTCGTGTGAAGCGTTAAACCAAG R-GCGGGATCCTTAGACACGTGTCGACGACTCATC | GFP/ μ NS(539-605) | 36,0 |
| pEGFP-C1-M3(381-448) | F-GCGGAATTCTATGCCATCCTTCTACTCGGTG R-GCGGGATCCTTATGGACCAACGGACGAATCG | GFP/ μ NS(381-635) | 37,7 |
| pEGFP-N1-M3(1-635) | F-GCGGAATTCATCATGGCGTCAACCAAGTGG R-GCGGGATCCCGCAGATCATCCACCAATTCTTC | μ NS(1-635)/GFP | 98,4 |
| pEGFP-N1-M3(1-605) | F-GCGGAATTCATCATGGCGTCAACCAAGTGG R-GCGGGATCCCGGACACGTGTCGACGACTCATC | μ NS(1-605)/GFP | 95,3 |
| pEGFP-N1-M3(1-542) | F-GCGGAATTCATCATGGCGTCAACCAAGTGG R-GCGGGATCCCGCGCTTCCACACGGGGTCCCAC | μ NS(1-542)/GFP | 87,9 |
| pEGFP-N1-M3(381-448) | F-GCGGAATTCATCATGGCGTCAACCAAGTGG R-GCGGGATCCCGTGGACCAACGGACGAATCG | μ NS(381-448)/GFP | 37,7 |

^a Cada construcción fue diseñada para expresar EGFP fusionada al extremo N-terminal o C-terminal de determinadas regiones de μ NS, incluyendo los residuos de μ NS indicados.

^b Para cada construcción, al cebador negativo (R) se le añadió un codón de stop, que está doblemente subrayado, y al cebador positivo un codón de iniciación, que está doblemente subrayado. Las dianas de EcoRI o BamHI incorporadas en el extremo 5' de los cebadores están subrayadas.

^c En cada una de las quimeras, GFP se fusionó al extremo amino o carboxilo de la región de μ NS indicada.

^d Tamaño esperado para las proteínas de fusión expresadas.

¹ Esta construcción se denomina GFP-C1-IC-C2-CT o GFP- μ NS-Mi en resultados.

² Esta construcción se denomina GFP-IC-C2-CT en resultados.

³ Esta construcción se denomina GFP-C1-IC-C2 en resultados.

⁴ Esta construcción se denomina GFP-IC en resultados.

ii) Fusiones a CA-C

Para expresar el dominio de CA-C de la proteína CA de la cápside del virus VIH o su versión mutada CA-C-M W184A (Mateu; 2002) fusionados al extremo N-terminal de la región de μ NS deseada, los plásmidos recombinantes pET21b(+)-CA-C(146-231) y pET21b(+)-CA-C-M W184A (146-231) se sometieron a PCR con los siguientes cebadores; como cebador positivo 5'-GCGGGATTTCATCATGAGCCCTACCAGCA TTCTGG-3' (la diana de BamHI está subrayada y el codon de iniciación está doblemente subrayado) y como cebador negativo 5'-GCGGAATTCCAAACTCTT GCCTTATGGCC-3' (la diana de EcoRI está subrayada). Los productos de PCR se digirieron y se clonaron en los plásmidos recombinantes listados en la Tabla 3.

Todas las construcciones se verificaron mediante secuenciación (Sistemas Genómicos SL, Valencia, España) y Weter-blot usando anticuerpos contra μ NS (datos no mostrados).

Tabla 3. Construcción de quimeras de μ NS con CA-C.

| Plásmido ^a | Construcción ^b | Proteína ^c | Tamaño(kDa) ^d |
|--------------------------|--|--|--------------------------|
| pCDNA3.1/Zeo-M3(477-635) | pCDNA3.1/Zeo-CA-C-M3(477-635) ¹ pCDNA3.1/Zeo-CA-C-M-W184A-M3(477-635) ² | CA-C- μ NS(477-635) ¹ CA-C-M-W184A- μ NS(477-635) ² | 28,3 28,2 |
| pCDNA3.1/Zeo-M3(539-635) | pCDNA3.1/Zeo-CA-C-M3(539-635) | CA-C- μ NS(539-635) | 21,2 |
| pCDNA3.1/Zeo-M3(448-605) | pCDNA3.1/Zeo-CA-C-M3(448-605) ³ pCDNA3.1/Zeo-CA-C-M-W184A-M3(448-605) ⁴ | CA-C- μ NS(448-605) ³ CA-C-M-W184A- μ NS(448-605) ⁴ | 28,2 28,1 |
| pCDNA3.1/Zeo-M3(477-605) | pCDNA3.1/Zeo-CA-C-M3(477-605) | CA-C- μ NS(477-605) | 25,2 |

^a Estos plásmidos se usaron para expresar fusiones del dominio de dimerización C-terminal de la proteína CA de la cápside del virus VIH CA-C (146-231) o su versión mutada CA-C-M W184A (146-231) a regiones de μ NS (ver Tabla 1).

^b Cada construcción fue diseñada para expresar el dominio de dimerización C-terminal de la proteína de la cápside CA del virus VIH CA-C (146-231) o su versión mutada CA-C-M W184A (146-231) fusionados a regiones de μ NS , incluyendo los residuos de μ NS indicados.

^c En cada una de estas proteínas, CA-C (146-231) o su versión mutada CA-C-M W184A (146-231) se fusionaron al extremo amino de las regiones de μ NS indicadas

¹ Esta construcción se denomina CA-C-IC-C2-CT en resultados.

² Esta construcción se denomina CA-C-M-IC-C2-CT en resultados.

³ Esta construcción se denomina CA-C-C1-IC-C2 en resultados.

⁴ Esta construcción se denomina CA-C-M-C1-IC-C2 en resultados.

iii) Fusiones a HA

Para expresar regiones de μ NS fusionadas a la hemaglutinina del virus influenza (HA) en su extremo C-terminal, la secuencia codificante del epítopo, los codones de iniciación y terminación y las dianas de enzimas de restricción se introdujeron con los cebadores durante la amplificación por PCR en la región del gen M3 que se quería amplificar. Las PCRs se realizaron usando como molde pGEMT-M3 (Tourís-Otero *et al.*, 2004b) y los cebadores listados en la Tabla 4. Los productos de PCR y el plásmido pCDNA3.1/Zeo se cortaron con EcoRI y XbaI y posteriormente se ligaron.

Todas las construcciones se verificaron mediante secuenciación (Sistemas Genómicos SL, Valencia, España) y Western-blot usando anticuerpos contra μ NS (datos no mostrados).

Tabla 4. Construcción de quimeras de μ NS con HA.

| Construcción ^a | Cebadores ^b (5'-3') | Proteína ^c | Tamaño(kDa) ^d |
|-----------------------------|---|-----------------------|--------------------------|
| pCDNA3.1/Zeo -M3(1-154)-HA | F-GCGGAATTCATC <u>ATGGCGTCAACCAAGTGG</u> R-GCGTCTAGATTACGCATAATCCGGCACATCATAACGGGGAATCAGCGGTGG | μ NS(1-154)-HA | 18,3 |
| pCDNA3.1/Zeo -M3(1-380)-HA | F-GCGGAATTCATC <u>ATGGCGTCAACCAAGTGG</u> R-GCGTCTAGATTACGCATAATCCGGCACATCATAACGGGATATGGAGACCGTCTAGCGAGAAG | μ NS(1-380)-HA | 43,4 |
| pCDNA3.1/Zeo -M3(1-448)-HA | F-GCG GAATTCATC <u>ATGGCGTCAACCAAGTGG</u> R-GCGTCTAGATTACGCATAATCCGGCACATCATAACGGGATATGGACCAACGGACGAATCG | μ NS(1-448)-HA | 50,6 |
| pCDNA3.1/Zeo -M3(1-477)-HA | F-GCGGAATTCATC <u>ATGGCGTCAACCAAGTGG</u> R-GCGTCTAGATTACGCATAATCCGGCACATCATAACGGGATATTCCTGAGCAGGTTGAACATC | μ NS(1-477)-HA | 53,8 |
| pCDNA3.1/Zeo-M3(539-635)-HA | F-GCGGAATTCATC <u>ATGGCGCGTGTGGAAGCGTTAAACCAAG</u> R-GCGTCTAGATTACGCATAATCCGGCACATCATAACGGGATACAGATCATCCCAATCTTTC | μ NS(539-635)-HA | 12,3 |
| pCDNA3.1/Zeo-M3(539-605)-HA | F-GCGGAATTCATC <u>ATGGCGCGTGTGGAAGCGTTAAACCAAG</u> R-GCGTCTAGATTACGCATAATCCGGCACATCATAACGGGATAGACACGTGTGCGACGACTCATC | μ NS(539-605)-HA | 9,2 |
| pCDNA3.1/Zeo-M3(477-542)-HA | F-GCGGAATTCATC <u>ATGGAAGATCACTTGTGGCTTATC</u> R-GCGTCTAGATTACGCATAATCCGGCACATCATAACGGGATACGCTTCCACACGGGGTTCCAC | μ NS(477-542)-HA | 8,8 |
| pCDNA3.1/Zeo-M3(381-448)-HA | F-GCGGAATTCATC <u>ATGCCATCCTTCTACTCGGTG</u> R-GCGTCTAGATTACGCATAATCCGGCACATCATAACGGGATATGGACCAACGGACGAATCG | μ NS(381-448)-HA | 8,2 |

^a Cada construcción fue diseñada para expresar el epítopo HA fusionado al extremo C-terminal de determinadas regiones de μ NS, incluyendo los residuos de μ NS indicados.

^b Para cada construcción, al cebador negativo (R) se le añadió la secuencia codificante del epítopo HA y un codón de stop, lo que está doblemente subrayado, y al cebador positivo un codón de iniciación, que está doblemente subrayado. Las dianas de EcoRI o XbaI incorporadas en el extremo 5' de los cebadores están subrayadas.

^c En cada una de las quimeras, el epítopo HA se fusionó al extremo carboxilo de la región de μ NS indicada.

^d Tamaño esperado para las proteínas expresadas.

3.2.7.2.1 Generación de quimeras de μ NS (2)

i) GFP-Intercoil

Para expresar la EGFP fusionada al extremo N-terminal de la región de μ NS que comprende los residuos 477 a 542, de manera que contenga un lugar de corte para el factor Xa entre ambas proteínas, el plásmido recombinante pGEMT-M3 (Tourís-Otero *et al.*, 2004b) se amplificó por PCR con los siguientes cebadores: el cebador positivo fue: 5'-GCGGAATTCTATCGAGGGAAGGGAAGATCACTTGTTGGCTTATC-3' (la diana de EcoRI está subrayada y el lugar de corte del factor Xa está doblemente subrayado) y el cebador negativo: 5'-GCGGGATCCTTACGCTTCCACACGGGGTTCCCAC-3' (la diana de BamHI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante y el vector pEGFP-C1 se cortaron con EcoRI y BamHI y posteriormente se ligaron para generar el plásmido recombinante pEGFP-C1-Xa- μ NS(477-542).

ii) p53-Intercoil

Para expresar la proteína p53 humana fusionada al extremo N-terminal de la región de μ NS que comprende los residuos 477 a 542, el plásmido recombinante pGEMT-M3 (Tourís-Otero *et al.*, 2004b) se amplificó por PCR con los siguientes cebadores. El cebador positivo fue: 5'-GCGTCTAGAATCATGGCGGAAGATCACTTGTTGGCTTATC-3' (la diana de XbaI está subrayada y el codón de iniciación está doblemente subrayado) y el cebador negativo fue 5'-GCGGGGCCCTTACGCTTCCACACGGGGTTCCCAC-3' (la diana de ApaI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante y el plásmido pCDNA3.1/Zeo se digirieron con ApaI y XbaI y posteriormente se ligaron para obtener el plásmido recombinante pCDNA3.1/Zeo- μ NS(477-542). A continuación, la secuencia codificante completa de p53 humana se amplificó mediante PCR usando como molde pCMV-wtp53 y los siguientes cebadores: el cebador positivo 5'-GCGGGATCCATCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCC-3' (la diana de BamHI está subrayada y el codón de iniciación está doblemente subrayado), y el cebador negativo 5'-GCGGAATTTCGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTTG-3' (la diana de EcoRI está subrayada). El producto de PCR resultante y el plásmido pCDNA3.1/Zeo- μ NS(477-542) se digirieron con BamHI y EcoRI y se ligaron, generándose el plásmido recombinante pCDNA3.1/Zeo-p53- μ NS(477-542).

iii) NLS-- μ NS

Para generar el plásmido recombinante pCDNA3.1/Zeo-NLS-Ag.T- μ NS, que expresa la proteína μ NS fusionada con la NLS del antígeno T en su extremo amino, el plásmido recombinante pGEMT-M3 (Tourís-Otero *et al.*, 2004b) se amplificó por PCR con los siguientes cebadores. El cebador positivo fue: 5'-GCGGAA TTCATCATGGGACCAAAGAAGAAGCGTAAAGTTATCATGGCGTCAACCAAGTGG-3' (la diana de EcoRI está subrayada y el codón de iniciación y la NLS del antígeno T está doblemente subrayado) y el cebador negativo fue 5'-GCGTCTAGATCACAGATCATCCACCAATTCTTC-3' (la diana de XbaI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante y el plásmido pCDNA3.1/Zeo se digirieron con EcoRI y XbaI y posteriormente se ligaron.

iv) NLS-GFP- μ NS

Para obtener el plásmido recombinante pCDNA3.1/Zeo-NLS-Ag.T-GFP- μ NS, que expresa la quimera GFP- μ NS fusionada a la NLS del antígeno T en su extremo amino, el plásmido recombinante pEGFP-C1-M3 (Tourís-Otero *et al.*, 2004b) se amplificó por PCR con los siguientes cebadores. El cebador positivo fue: 5'-GCGGGATCCATCATGGGACCAAAGAAGAAGCGTAAAGTTACCATGGTGAGCAAGGGCGAG -3' (la diana de BamHI está subrayada y el codón de iniciación y la NLS del antígeno T está doblemente subrayada) y el cebador negativo fue 5'-GCGTCTAGATCACAGATCATCCACCAATTCTTC-3' (la diana de XbaI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante y el plásmido pCDNA3.1/Zeo se digirieron con BamHI y XbaI y posteriormente se ligaron.

v) NLS-GFP- μ NS-Mi

Para generar el plásmido recombinante pCDNA3.1/Zeo-NLS-Ag.T-GFP- μ NS(448-635), que expresa la quimera GFP- μ NS(448-635) fusionada con la NLS del antígeno T en su extremo amino, el plásmido recombinante pEGFP-C1-M3(448-635) (ver Tabla 2) se amplificó por PCR con los mismos cebadores que en el caso anterior. El producto de PCR resultante y el plásmido pCDNA3.1/Zeo se digirieron con BamHI y XbaI y posteriormente se ligaron.

vi) VP16-GFP- μ NS

Para obtener el plásmido recombinante pVP16-GFP- μ NS, que expresa la quimera GFP- μ NS fusionada al extremo carboxilo de un dominio de activación que contiene la NLS del antígeno T (denominada VP16-GFP- μ NS en resultados), el plásmido recombinante pEGFP-C1-M3 (Tourís-Otero et al., 2004b) se amplificó por PCR con los siguientes cebadores. El cebador positivo fue: 5'-GCGGGATCCGTACC ATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' (la diana de BamHI está subrayada y el codón de iniciación esta doblemente subrayado) y el cebador negativo fue 5'-GCGTCTAGATCACAGATCATCCACCAATTCTTC-3' (la diana de XbaI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante y el plásmido pVP16 se digirieron con BamHI y XbaI y posteriormente se ligaron.

vii) GAL4-Intercoil

Para generar el plásmido recombinante pM- μ NS(477-542), que expresa la región μ NS(477-542) fusionada en su extremo amino con el domino de unión a DNA GAL4, el plásmido recombinante pGEMT-M3 (Tourís-Otero et al., 2004b) se amplificó por PCR con los siguientes cebadores. El cebador positivo fue: 5'-GCGGAATTCATCATGGAAGATCACTTGTTGGCTTATC-3' (la diana de EcoRI está subrayada) y el cebador negativo fue: 5-GCGTCTAGATTTACGCTTCCAC ACGGGGTTCAC-3' (la diana de XbaI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante y el plásmido pM se digirieron con EcoRI y XbaI y posteriormente se ligaron.

viii) pM- μ NS y pVP16- μ NS

Los vectores pM y pVP16 suministrados con el kit del doble híbrido “Mammalian Matchmaker” (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia) se usaron para expresar el dominio de unión a DNA GAL4 y el dominio de activación transcripcional VP16 fusionados al extremo amino de μ NS. Para generar los plásmidos recombinantes pM- μ NS y pVP16- μ NS, el plásmido recombinante pGMT-M3 (Tourís-Otero et al., 2004b) se sometió a PCR con los siguientes cebadores; como cebador positivo: 5'-GCGGAATTCATCATGGCGTCAACCAAGTGG-3' (la diana de EcoRI está subrayada) y como cebador negativo: 5'-GCGTCTAGATCACAGATCATCCAC CAATTCTTC-3'

(la diana de XbaI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). Los productos de PCR resultantes se digirieron y se clonaron en los vectores pM y pVP16.

Todas las construcciones obtenidas se verificaron mediante secuenciación (Sistemas Genómicos SL, Valencia, España) y Western-blot usando anticuerpos contra μ NS, p53 y GFP (datos no mostrados).

3.3. Expresión y manipulación de proteínas

3.3.1. Creación de baculovirus recombinantes

Todos los baculovirus recombinantes se generaron transfectando Sf9 con bácmidos creados con el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen, Barcelona, España). Para ello se clonaron los cDNAs obtenidos por PCR en el plásmido pFastBac1, tal y como se describe más adelante. Los plásmidos recombinantes se comprobaron por análisis de restricción y secuenciación y se utilizaron para transfectar células DH10Bac™ competentes (Invitrogen, Barcelona, España), donde se generan los bácmidos por transposición. Las colonias positivas se replaquearon y comprobaron por PCR con cebadores comerciales M13 (Invitrogen, Barcelona, España), tal y como recomienda el fabricante en sus instrucciones. La transfección de células Sf9 se llevó a cabo usando Cellfectin (Invitrogen, Barcelona, España). Transcurridas 72 h el medio de cultivo contiene aproximadamente 1×10^7 ufp/ml de baculovirus recombinantes. Luego de realizar varios pases para crecer el virus y aumentar el título viral, se realizaron ensayos de expresión para seleccionar el clon a utilizar. Los stocks baculovirales se almacenaron a 4°C en ausencia de luz.

i) Bac- μ NS

Para generar el baculovirus recombinante que expresa la proteína μ NS del reovirus aviar S1133, la secuencia codificante de μ NS se amplificó por PCR usando como molde el vector pGMT-M3 (Tourís-Otero *et al.*, 2004b) y como cebador positivo: 5'-GCGGAATTCATCATGGCGTCAACCAAGTG-3' (la diana de EcoRI está subrayada y el codón de iniciación doblemente subrayado) y cebador negativo: 5'-GCGTCTAGATCACAGATCATCCACCAATTCTTC-3' (la diana de XbaI está subrayada y

el codón de stop doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas de restricción de EcoRI y XbaI del pFastBac1 para obtener el pFastBac1- μ NS, el cual se usó para generar el baculovirus recombinante Bac- μ NS.

ii) Bac- μ NS-Mi

Para expresar la proteína recombinante μ NS(448-635) (denominada μ NS-Mi en resultados) en células de insecto, la secuencia codificante de μ NS(448-635) se amplificó por PCR usando como molde el vector pGMT-M3 (Tourís-Otero *et al.*, 2004b) y como cebador positivo: 5'-GCGGAATTCATCATGCCAGCCGTACTGCTGTCTA-3' (la diana de EcoRI está subrayada y el codón de iniciación doblemente subrayado) y cebador negativo: 5'-GCGTCTAGATCACAGATCATCCACCAATTCTTC-3' (la diana de XbaI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas de restricción de EcoRI y XbaI del pFastBac1 para obtener el pFastBac1- μ NS(448-635), el cual se usó para generar el baculovirus recombinante Bac- μ NS(448-635).

iii) Bac-GFP-C1-IC-C2

Para expresar la proteína recombinante GFP- μ NS(448-605) en células de insecto, la secuencia codificante de GFP- μ NS(448-605) presente en el plásmido pEGFP-C1-M3(448-605) (ver Tabla 2) se amplificó por PCR utilizando como cebador positivo: 5'-GCGGGATCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' (la diana de BamHI está subrayada y el codón de iniciación está doblemente subrayado) y cebador negativo 5'-GCGTCTAGATTAGACACG TGTCGCACGACTCATC-3' (la diana de XbaI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas de restricción de BamHI y XbaI del pFastBac1 para obtener el pFastBac1-GFP- μ NS(448-605), el cual se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-GFP- μ NS(448-605).

iv) Bac-CA-C-C1-IC-C2

Para generar el baculovirus recombinante que expresa la quimera CA-C(146-231)- μ NS(448-605), el plásmido pCDNA3.1/Zeo-CA-C-M3(448-605) se digirió con BamHI y XbaI, y el inserto resultante se clonó en el pFastBac1, obteniéndose el pFastBac1-CA-C(146-231)- μ NS(448-605), el cual se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-CA-C(146-231)- μ NS(448-605).

v) *Bac-GFP-Intercoil*

Para expresar la proteína recombinante GFP-Xa-μNS(477-542) en células de insecto, la secuencia codificante de GFP-Xa-μNS(477-542) presente en el plásmido pEGFP-C1-Xa-μNS(477-542) se amplificó por PCR utilizando como cebador positivo 5'- GCGGGATCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' (la diana de BamHI está subrayada y el codón de iniciación está doblemente subrayado) y cebador negativo 5'- GCGTCTAGATTACGCTTCCACACGGGGTTCAC -3' (la diana de XbaI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas de restricción de BamHI y XbaI del pFastBac1 para obtener el pFastBac1-GFP-Xa-μNS(477-542), el cual se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-GFP-Xa-μNS(477-542).

vi) *Bac-GFP*

Para generar el baculovirus recombinante que expresa la proteína EGFP, la secuencia codificante de EGFP se amplificó por PCR usando como molde el vector pEGFP-C1 y como cebador positivo: 5'-GCGGAATTCACCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' (la diana de EcoRI está subrayada y el codón de iniciación está doblemente subrayado) y cebador negativo: 5'-GCGTCTAGATTACTTGTACAGCTC GTCCATGCC-3' (la diana de XbaI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas de restricción de EcoRI y XbaI del pFastBac1 para obtener el pFastBac1-GFP que se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-GFP.

vii) *Bac-GFP-μNS-Mi*

Para generar el baculovirus recombinante que expresa la proteína GFP-μNS(448-635), la secuencia codificante de GFP-μNS(448-635) se amplificó por PCR usando como molde el vector pEGFP-C1-M3(448-635) (ver Tabla 2) y como cebador positivo 5'-GCGGGATCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' (la diana de BamHI está subrayada y el codón de iniciación está doblemente subrayado) y cebador negativo 5'-GCGTCTAGATCACAGATCATCCACCAATTCTTC-3' (la diana de XbaI está subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas de restricción de BamHI y XbaI del pFastBac1 para obtener el pFastBac1-GFP-μNS(448-635), que se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-GFP-μNS(448-635).

viii) Bac-GFP- μ NS

Para generar el baculovirus recombinante que expresa la proteína GFP- μ NS, la secuencia codificante de GFP- μ NS se amplificó por PCR usando como molde el vector pGFP-C1-M3 (Tourís-Otero *et al.*, 2004b) y como cebador positivo 5'-GCGGG ATCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAG -3' (la diana de BamHI esta subrayada y el codón de iniciación esta doblemente subrayado) y como cebador negativo 5'-GCGTC TAGATCACAGATCATCCACCAATTCTTC-3' (la diana de XbaI esta subrayada y el codón de stop esta doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas de restricción de BamHI y XbaI del pFastBac1 para obtener el pFastBac1-GFP- μ NS, que se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-GFP- μ NS.

ix) Bac-Luc

Para generar el baculovirus recombinante que expresa la luciferasa (*Photinus pyralis*), la secuencia codificante de la proteína se amplificó por RT-PCR usando como molde el RNA mensajero de la luciferasa, que suministra como control positivo el sistema de lisado de reticulocito de conejo (Promega, Madrid, España), y como cebador positivo 5'- GCGGG ATCCATCATGGAAGACGCCAAAAAC-3' (la diana de BamHI esta subrayada y el codón de iniciación esta doblemente subrayado) y cebador negativo 5'-GCATAAGAAT GCGGCCGCTTACAATTTGGACTTTCCGCCC-3' (la diana de NotI esta subrayada y el codón de stop esta doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas de restricción de BamHI y NotI del pFastBac1 para obtener el pFastBac1-Luciferasa, que se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-Luciferasa.

x) Bac-Luc-Intercoil

Para expresar la proteína recombinante luciferasa (*Photinus pyralis*) fusionada al extremo N-terminal de la región de μ NS que comprende los residuos 477 a 542 en células de insecto, el plásmido recombinante pGEMT-M3 (Tourís-Otero *et al.*, 2004a) se amplificó por PCR con los siguientes cebadores. El cebador positivo fue: 5'-GCATAAGAAT CTCGAGATCATGGCGGAAGATCACTTGTTGGCTTATC-3' (la diana de XhoI esta subrayada y el codón de iniciación esta doblemente subrayado) y el cebador negativo fue: 5'-GCATAAGAATA AAGCTTTTACGCTTCCACACGGGGTTC

CCAC-3' (la diana de HindIII esta subrayada y el codón de stop está doblemente subrayado). El producto de PCR resultante se digirió con XhoI y HindIII y posteriormente se ligó al plásmido pFastBac1, el cual se cortó con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido recombinante pFastBac1- μ NS(477-542). A continuación, la secuencia codificante completa de la luciferasa se amplificó mediante PCR usando como molde el pFastBac1-Luciferasa y los siguientes cebadores: el cebador positivo 5'-GCGGGATCCATCATGGAAGACGCCAAAAAC-3' (la diana de BamHI esta subrayada y el codón de iniciación esta doblemente subrayado), y el cebador negativo 5'-GCATAAGAATGCGGCCGCCAATTTGGACTTTCCGCCC-3' (la diana de NotI esta subrayada). El producto de PCR resultante se digirió y clonó entre las dianas de restricción de BamHI y NotI del pFastBac1- μ NS(477-542) para obtener el pFastBac1-Luciferasa- μ NS(477-542) el cual se usó para generar el baculovirus recombinante Bac-Luciferasa-Intercoil.

Todos los plásmidos recombinantes fueron verificados mediante secuenciación (Sistemas Genómicos SL, Valencia, España).

3.3.2. Expresión de proteínas con baculovirus

Tras determinar el título de los diferentes baculovirus recombinantes utilizados, infectamos con 5 ufp/célula un frasco con células Sf9 en suspensión ($1,5 \times 10^6$ células/ml) con una viabilidad superior al 99%. Las células se mantuvieron en un matraz erlenmeyer agitándose a 120 rpm durante tres días a 28°C, punto en el cual la expresión de proteínas bajo el promotor de la polihedrina suele alcanzar el máximo.

3.3.3. Purificación de inclusiones

Tres días después de la infección con el correspondiente baculovirus, las células se centrifugaron durante 10 min a 1000 x g. El pellet se resuspendió en 10 ml de tampón hipotónico y se puso en hielo durante 15 min para facilitar el lisado de las células. El extracto celular resultante se centrifugó durante 10 min a 2000 x g, y el pellet resultante se resuspendió en 10 ml de tampón hipotónico; el pellet resuspendido se centrifugó a 2000 x g durante 10 min y se lavó dos veces en un volumen de 10 ml de tampón hipotónico. Posteriormente, el pellet se resuspendió en el mismo volumen de tampón

hipotónico y se sonicó (45 ciclos de 6 pulsos; 0,5 ciclos y amplitud 50), para romper los núcleos celulares y fragmentar el DNA. El extracto sonicado se centrifugó a 200 x g durante 5 min y el pellet se resuspendió en 5 ml de tampón hipotónico y se lavó 5 veces en el mismo volumen de tampón hipotónico mediante centrifugación (200 x g/5 min). Posteriormente, el pellet resultante se resuspendió en 1 ml de tampón hipotónico.

3.3.4. Purificación de la proteína GFP asociada a inclusiones

Transcurridos tres días desde la infección con los correspondientes baculovirus (controles negativos: Bac- μ NS/Bac-GFP o Bac- μ NS-Mi/Bac-GFP; o muestra objeto de estudio: Bac- μ NS/Bac-GFP-Intercoil o Bac- μ NS-Mi/Bac-GFP-Intercoil) las células se centrifugaron durante 10 min a 1000 x g. El pellet se resuspendió en 10 ml de tampón hipotónico y se puso en hielo durante 15 min para facilitar el lisado de las células. Los primeros pasos de la purificación son idénticos a los indicados en el apartado anterior. El pellet resultante se resuspendió en 1 ml de tampón hipotónico en el caso de los controles negativos, y en tampón hipotónico con 500 mM de NaCl en el caso de las muestras objeto de estudio. La muestra resuspendida en sal se centrifugó durante 5 min a 16000 x g, y el sobrenadante se pasó a través de una columna de desalado (HiTrap™ Desalting Column; GE Healthcare, Madrid, España). El eluido se centrifugó durante 5 min a 16000 x g, quedándonos con el sobrenadante. Finalmente, el sobrenadante se incubó con Factor Xa (New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra) (dilución 1:1000) y dos días más tarde se centrifugó durante 5 min a 16,000 x g, quedándonos con el sobrenadante, en donde se observó que la mayor parte GFP-Intercoil había sido cortada a GFP (Figura 32B). Para asegurarnos que toda la GFP-Intercoil se había digerido, se incubó un día más con el factor Xa, se centrifugó durante 5 min a 16000 x g y el sobrenadante resultante se cargó en una columna de Q-Sepharose (GE Healthcare, Madrid, España) preequilibrada con tampón hipotónico. La columna se eluyó con concentraciones crecientes de NaCl y las fracciones recogidas se analizaron por SDS-PAGE, detectándose la presencia de GFP en la elución de 400 mM de NaCl (datos no mostrados). Finalmente, la proteína se concentró y se cargó en un gel, observándose una única banda de unos 30 kDa, que mediante Western-blot se comprobó que se trataba de GFP (Figura 32C y 33C).

3.3.5. Purificación de luciferasa asociada a inclusiones

La purificación de la luciferasa etiquetada con el Intercoil se realizó tal y como se describe en el apartado de purificación de las inclusiones. En este caso, como control negativo usamos: Bac-GFP- μ NS-Mi/Bac-luc; y como muestra objeto de estudio: Bac-GFP- μ NS-Mi/Bac-luc-inter). La única diferencia con respecto al protocolo descrito anteriormente, es que antes de comenzar con la purificación se ajustó la actividad de luciferasa presente en los extractos celulares mediante dilución con tampón hipotónico.

3.3.6. Análisis electroforético en geles SDS-PAGE

La electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) se llevó a cabo tal y como describe Laemmli (1970). Las concentraciones de poliacrilamida o de ProtoGel (National Diagnostic, England) empleadas para el gel separador fueron del 10%, 12.5% o del 15%, y para el gel concentrador del 4%. Después de la electroforesis, las proteínas se fijaron y tiñeron con 0,25% azul de Coomassie en 33% metanol y 10% ácido acético y se destiñeron en la misma disolución sin colorante.

3.4. Manipulación de cultivos celulares y virus

3.4.1. Condiciones de manipulación

La manipulación de los materiales biológicos (líneas celulares y preparaciones virales) se realizó en condiciones estériles en el interior de una cabina de flujo laminar vertical. Las líneas celulares y los cultivos primarios se mantuvieron en el interior de un incubador Napco a 37°C, con una humedad relativa del 95% y una presión parcial de CO₂ del 5%. El material desechable se esterilizó en la autoclave antes de su eliminación definitiva.

Las células de insecto se mantuvieron en monocapa o suspensión (120 rpm) en el interior de un incubador Sanyo e Innova, respectivamente, con humedad ambiental sin CO₂ y a una temperatura de 28°C.

3.4.2. Propagación y conservación de líneas celulares

En el proceso de congelación, las células de los cultivos confluentes se disgregaron y se centrifugaron durante 5 min a 600 x g. Las células sedimentadas se resuspendieron en 500 µl de medio de cultivo y se añadieron 500 µL de medio de congelación (D-MEM o 199 suplementado con 40% de FBS y 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotector). Las suspensiones celulares se dispensaron en alícuotas de 1 ml, en criotubos de conservación estériles. Los viales se mantuvieron a 4°C durante 5 min, transfiriéndose posteriormente a -80°C y, tras mantenerlos al menos 24 h a esa temperatura, se almacenaron en nitrógeno líquido para períodos largos de conservación.

La descongelación de las células se realizó sumergiendo los viales en un baño de agua a 37°C para conseguir una descongelación rápida. Posteriormente, el contenido del vial se transfirió a tubos que contenían medio de cultivo completo previamente calentado a 37°C, y se centrifugaron durante 5 min a 600 x g para eliminar el medio de congelación. A continuación, las células sedimentadas se resuspendieron en medio de cultivo, se transfirieron a frascos de cultivo celular con medio y se incubaron a 37°C. El medio se renovó antes de las 24 h para eliminar las posibles trazas de agente crioprotector y evitar una elevación de pH.

3.4.3. Obtención de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF)

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de embriones de pollo de 9 a 10 días de incubación, cedidos por Intervet (Salamanca). La cáscara se lavó con etanol y se colocó sobre un soporte con el polo más ancho hacia arriba. Con pinzas estériles se abrió el cascarón y se rompió la membrana corialantoidea para penetrar en la cavidad amniótica. El embrión extraído del huevo se decapitó y evisceró. El tejido resultante se introdujo en un volumen de 250 ml PBS precalentado a 37°C y se troceó mecánicamente con ayuda de unas tijeras. La papilla resultante se digirió con tripsina (10 ml de tripsina al 0,25 % en PBS/embrión) a 37°C durante 1 h, tras lo cual se filtró a través de una rejilla metálica. Se centrifugó a 1500 x g por durante 35 min. El pellet celular resultante se resuspendió en un volumen adecuado de medio 199 precalentado a 37°C y suplementado con 10% TPB, 5% de suero, antibióticos y fungizona. La

suspensión celular se sembró en placas que se incubaron a 37°C en un incubador de CO₂

3.4.4. Crecimiento y titulación de virus

Para la preparación de stocks del reovirus aviar S1133, monocapas confluentes de CEF, sembradas en placas de 150 mm de diámetro, se incubaron con virus a una multiplicidad de infección de 0,1 ufp/célula. Tras 90 min de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se añadió medio 199 suplementado con 2% FBS, continuándose la incubación a 37°C durante 24 h. Las células se recogieron en un pequeño volumen de medio de infección y se almacenaron a -20° C hasta su utilización.

Las titulaciones virales se realizaron mediante ensayo en placa sobre monocapas confluentes de CEF. Las monocapas se sembraron en placas de 35 mm de diámetro y, antes de realizar el ensayo, se prepararon diluciones seriadas de las suspensiones virales en PBS. Se realizaron infecciones por duplicado con 0,2 ml por placa de cada dilución. Tras el período de adsorción se retiró el inóculo y se añadieron 4 ml del medio adecuado para cada tipo de cultivo, suplementado con 1% de agar, 4% de FBS, 2% de glutamina y 1% de antibióticos. Tras 10 min a temperatura ambiente, las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ hasta la aparición de calvas de lisis (aproximadamente 3 días). Las monocapas se tiñeron con 1 ml de 0,25 mg/ml de rojo neutro en PBS y se calculó el título viral a partir del número de calvas formadas en cada dilución.

3.4.5. Transfección de células eucariotas con plásmidos de expresión transitoria

Se crecieron monocapas subconfluentes de células (aproximadamente 70% de confluencia), en placas de 12 pocillos. La transfección se llevó a cabo con complejos de DNA-liposomas empleando el sistema lipofectAMINE plus (Invitrogen, Barcelona, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se mantuvieron a 37°C durante 3 h. Al cabo de ese tiempo, se retiró la mezcla de transfección y se añadió medio suplementado con 10% FBS.

3.4.6. Ensayo del doble híbrido en células de mamífero

Para realizar los ensayos de doble híbrido adaptado a células de mamífero se utilizó el sistema “Mammalian Matchmaker two-hybrid” (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia) siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante.

El día anterior a la transfección, se cultivaron células COS-7 en placas de 12 pocillos a una densidad aproximada de 5×10^4 células por pocillo. Posteriormente, se transfectaron con el plásmido reportero pG5luc (que contiene el ORF de la luciferasa y 5 lugares de unión del GAL4) junto con pM- μ NS y pVP16- μ NS en un ratio de 1:1:1. Las células también se transfectaron con los plásmidos control incluidos en el Kit: pM; pVP16; pM53 (que expresa el dominio de unión a DNA GAL-4 fusionado a p53 de ratón) y pVP16-T (que expresa el dominio de activación VP16 fusionado al antígeno T del SV40). Transcurridas 48 h. a 37°C se lisaron las células y se determinó la actividad de luciferasa presente en los extractos usando un luminómetro Luminoskan-Ascent (Thermo, Waltham, Massachusetts, USA). Como mezcla de reacción para medir la actividad de luciferasa se preparó una solución conteniendo un 80% de tampón de la luciferasa (ver soluciones y tampones) y un 10% de 100 mM de ATP y de 200 mM de $MgCl_2$. Posteriormente, a esta solución se le añadió el sustrato luciferina (20 mM) (Biaffin, Kassel, Alemania) para que quedase a una concentración de final de (1 mM). Los resultados de seis medidas por pocillo \pm la desviación Standard se expresan como unidades relativas de luz (U.R.L). Cada ensayo del doble híbrido se realizó al menos tres veces, obteniéndose resultados muy similares.

3.4.7. Determinación de la actividad de la luciferasa

Células Sf9 se infectaron con Bac-Wt, Bac-Luc, Bac-Luc-IC. Transcurridas 72 h a 28°C se lisaron las células y se determinaron los niveles de la actividad de luciferasa presente en los extractos tal y como se indica en el apartado anterior. Las medidas se realizaron por triplicado y en los resultados se muestran seis medidas por pocillo \pm la desviación standard. Los datos se expresan como unidades relativas de luz (U.R.L). En el caso de la purificación de la luciferasa-Intercoil se cogieron muestras de cada uno de los pasos de la purificación se diluyeron 1/200 y se midió la actividad de luciferasa como se indica arriba.

3.5. Técnicas inmunológicas

3.5.1. Transferencia de proteínas e inmunodetección por Western-blot

Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana PVDF/Immobilon-P (Millipore, Madrid, España) en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol), durante 1 h a 100 voltios. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBST (PBS conteniendo 0,05% Tween). La inmunodetección se realizó con los anticuerpos diluidos en PBST con incubaciones de 60 min y lavados con PBST para retirar los anticuerpos no unidos específicamente. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron mediante peroxidasa con el substrato de HRP (“horseradish peroxidase”) quimioluminiscente de Millipore (Madrid, España).

3.5.2. Inmunofluorescencia

En el caso de inmunofluorescencia indirecta, las células se fijaron con metanol a -20°C durante 15 min, o con 4% paraformaldehído (Sigma, Madrid, España) a 37°C durante 10 min. A continuación se lavaron con PBS, y en el caso de la fijación con paraformaldehído se permeabilizaron con 0,5% Tritón X-100 en PBS durante 5 min. Se lavaron con PBS y se incubaron en presencia de 2% BSA en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se incubaron con una solución del anticuerpo primario diluido en 2% BSA en PBS durante 1 h a 37°C . Tras dos lavados con PBS, se incubaron con una solución del segundo anticuerpo y DAPI 100 $\mu\text{g/ml}$ (tinción nuclear) diluidos en 2% BSA en PBS durante 1 h a 37°C . Las células se lavaron tres veces con PBS y se montaron sobre una gota de medio de montaje (ver soluciones y tampones) en un portaobjetos, para su observación al microscopio de fluorescencia.

Cuando se quiso observar al microscopio de fluorescencia la proteína GFP o proteínas fusionadas a la GFP, el procedimiento fue el siguiente. Las células se fijaron con 4% paraformaldehído y tras lavar con PBS y permeabilizar con tritón X-100 se montaron sobre una gota de medio de montaje en un portaobjetos.

Las fotografías de inmunofluorescencias de este trabajo muestran datos representativos. Cada experimento se reprodujo al menos tres veces y las células mostradas son representativas de los efectos observados para las condiciones ensayadas.

Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Olympus DP-71 montada sobre un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Las fotos obtenidas se procesaron con Adobe Photoshop (Adobe Systems, California, USA).

3.5.3. Microscopia electrónica de barrido

Para llevar a cabo la visualización de las inclusiones tubulares (GFP-C1-IC-C2) en microscopio electrónico de barrido, se purificaron previamente a partir de células Sf9 infectadas con el correspondiente baculovirus siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.3. de métodos. Los tubos puros en solución se colocaron en portas de acero de 1 cm de diámetro y 0,5 de altura hasta su completo secado. Finalmente, se sombrearon las muestras con oro utilizando un Metalizador E 5000 de Bio-Rad para su observación. La muestra se visualizó con microscopio electrónico de barrido (SEM) LEO-435VP a 30 kv.

3.6. Tratamiento bioinformático de las secuencias

Para el análisis básico de las secuencias obtenidas (sitios de restricción, secuencia que codifican las pautas de lectura, pesos moleculares teóricos, etc.) se utilizó el programa Protein Sequence Analysis 3.3 (Ira W. Palmer, Gaithersburg, MD, USA).

Las secuencias de las proteínas se compararon con las de otras proteínas conocidas usando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997) contra secuencias almacenadas en el GenBank (NCBI, USA).

El alineamiento de secuencias de proteínas se llevó a cabo con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

La predicción de los dominios coiled-coil se hizo con el programa Coils (Lupas *et al.*, 1991; 1996).

IV. RESULTADOS

1. RELACIÓN ENTRE LAS FACTORÍAS VIRALES DEL REOVIRUS AVIAR Y LAS INCLUSIONES FORMADAS POR LA PROTEÍNA μ NS Y LOS AGRESOMAS

El objetivo fundamental de este trabajo era estudiar el papel que desempeña la proteína μ NS de los reovirus aviares en la formación de factorías virales en células infectadas. Como se ha comentado en la introducción, algunos virus construyen sus factorías utilizando mecanismos similares a los que usa la célula para formar agresomas o autofagosomas, y numerosos virus utilizan el sistema de transporte a través de los microtúbulos para la generación y maduración de sus factorías viales. En la primera parte de este estudio intentamos determinar si los viroplasmas formados por el reovirus aviar en células infectadas y las inclusiones generadas por la sobreexpresión de μ NS en células transfectadas están relacionadas con los agresomas/autofagosomas y/o el citoesqueleto. Para ello, analizamos por inmunofluorescencia la presencia de proteínas marcadoras de agresomas y del citoesqueleto en las factorías virales de células infectadas y en las inclusiones que forma μ NS en células transfectadas. Monocapas de células CEF se infectaron con el reovirus aviar S1133 o se transfectaron con el plásmido pCINeo- μ NS y, a las 18 h post-infección o post-transfección, las células se fijaron con metanol y se incubaron con anticuerpos policlonales contra μ NS y con anticuerpos monoclonales contra: i) conjugados de ubiquitina; ii) α -tubulina (para teñir los microtúbulos); iii) γ -tubulina (para teñir el MTOC); o iv) vimentina (para detectar la formación de agresomas). Los resultados revelaron que la factorías virales de células infectadas con el reovirus aviar (Figura 15, fila 1) y las inclusiones que forma μ NS en células transfectadas (Figura 15, fila 2) no están ubiquitinadas, no colocan con microtúbulos ni con el MTOC, y no están rodeadas por jaulas de vimentina, lo que demuestra que las factorías virales y las inclusiones que forma μ NS no están relacionadas con agresomas/autofagosomas.

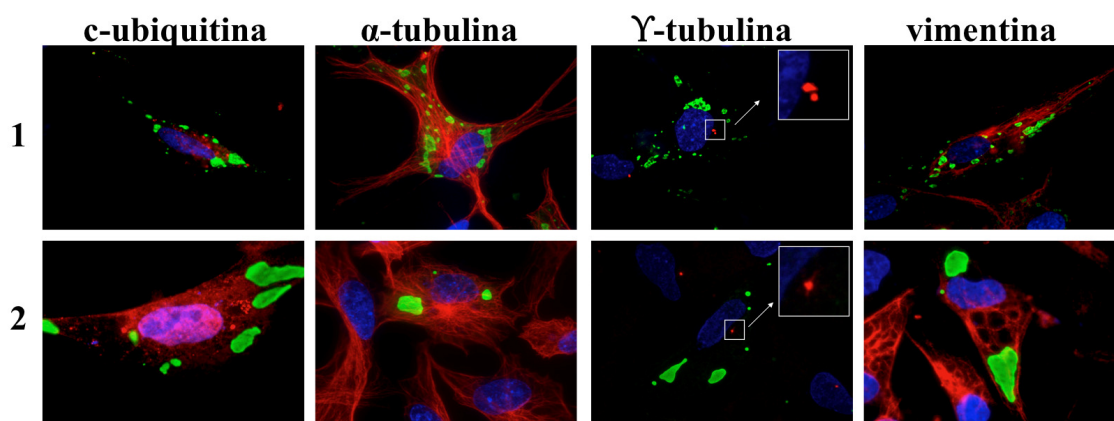


Figura 15. Relación de las factorías virales del reovirus aviar y de las inclusiones que forma μ NS con los agresomas. Monocapas semiconfluentes de células CEF se infectaron con 5 ufp/célula de reovirus aviar S1133 (fila 1), o se transfectaron con 1 μ g de pCINeo- μ NS (S1133) (fila 2). Las células se fijaron a las 18 h post-infección (h.p.i.) o 18 h post-transfección (h.p.t.), y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra μ NS (verde) y con anticuerpos monoclonales contra las proteínas indicadas en la parte superior de la figura (rojo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. En los paneles en donde se tiñe la γ -tubulina se muestra una imagen ampliada del MTOC.

Para investigar la implicación de los microtúbulos en la formación/maduración de las inclusiones del reovirus aviar, examinamos el efecto del nocodazol sobre la morfología, evolución y localización intracelular de estas estructuras. En experimentos preliminares, encontramos que el tratamiento de células CEF con 10 μ M nocodazol durante 1 h despolimeriza completamente los microtúbulos, por lo que decidimos usar esa concentración para los experimentos descritos abajo. Monocapas de células CEF se infectaron con el reovirus aviar S1133 (Figura 16A) o se transfectaron con el plásmido que expresa μ NS (Figura 16B), en presencia (+Noc) o ausencia de nocodazol desde las 0 hasta las 18 h. El análisis de las células por inmunofluorescencia usando anticuerpos contra μ NS y α -tubulina, reveló que el tamaño de las inclusiones aumenta desde las 6 hasta las 18 h post-infección o post-transfección (Figura 16A y 16B, comparar paneles 1 y 2), indicando que las inclusiones iniciales pequeñas se fusionan para formar otras más grandes a medida que progresa la infección/transfección. Además, a pesar de que los microtúbulos se despolimerizaron tan pronto se le añadió el nocodazol, la presencia de la droga no causó un cambio significativo en el tamaño y la distribución intracelular de las inclusiones a las 18 h post-infección o post-transfección (Figura 16A y 16B, comparar paneles 2 y 3). Obtuvimos resultados similares a los mostrados en la figura 16 usando concentraciones de nocodazol de 20 y 30 μ M (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que no existe una asociación entre las factorías de reovirus aviar y los microtúbulos celulares y que no se requiere un transporte retrógrado a través de los

microtúbulos para la maduración de las inclusiones, a diferencia de lo que ocurre con las factorías de los reovirus de mamífero y de muchos otros virus (Broering et al., 2002; Parker et al., 2002; Wileman, 2007).

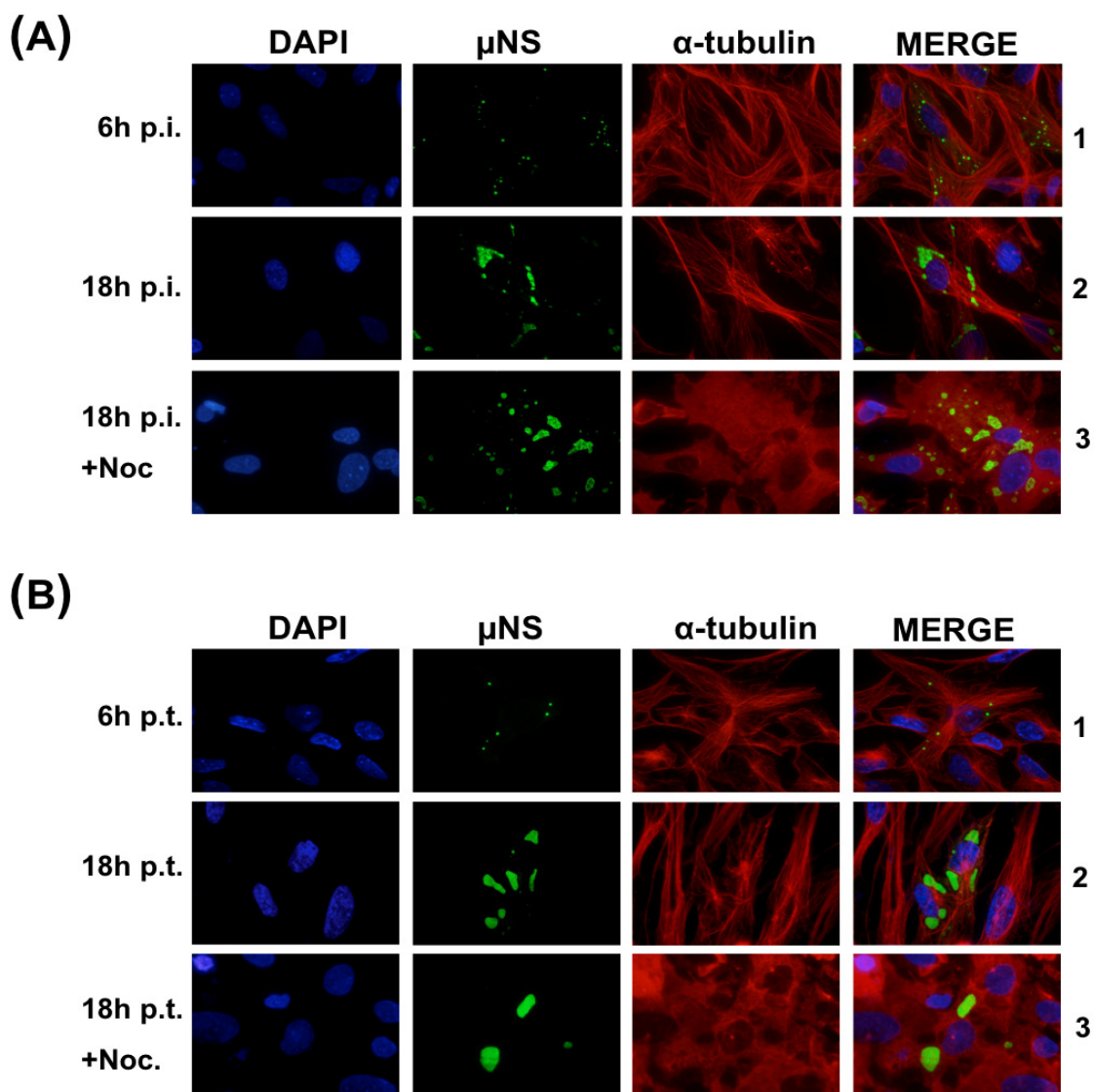


Figura 16. Relación de los microtúbulos con las factorías virales del reovirus aviar y con las inclusiones formadas por la proteína μ NS. A- Monocapas semiconfluentes de células CEF se infectaron con 5 ufp/célula de reovirus aviar S1133 y se trataron con 10 μ M de nocodazol desde las 0 hasta las 18 h post-infección (18 h.p.i.+Noc.) o se dejaron sin tratar (6 h.p.i.; 18h.p.i.). Las células se fijaron a los tiempos post-infección (h.p.i.) indicados a la izquierda de la figura y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra μ NS (verde). Los microtúbulos se visualizaron mediante inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra α -tubulina (rojo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. B- Lo mismo que en A, pero en este caso las células se transfectaron con pCINeo- μ NS (S1133). Las células se trataron con 10 μ M de nocodazol desde las 0 hasta las 18 h post-transfección (18 h.p.t.+Noc.) o se dejaron sin tratar (6 h.p.t.; 18h.p.t.), y se fijaron a las horas post-transfección (h.p.t.) indicadas a la izquierda de la figura. La detección por inmunofluorescencia se realizó como se indica en A.

2. CARACTERIZACIÓN DEL ESTATUS OLIGOMÉRICO DE LA PROTEÍNA μ NS

En un estudio anterior realizado en nuestro laboratorio se demostró que la transfección de células CEF con un plásmido de expresión de μ NS resulta en la formación de inclusiones globulares con aspecto similar al de las factorías virales formadas por los reovirus aviares en células infectadas (Tourís-Otero *et al.*, 2004a). Esto sugiere que la proteína μ NS es el factor viral mínimo necesario para formar factorías en células infectadas con reovirus aviar. Sin embargo, el posible estatus oligomérico de esta proteína o su capacidad para auto-asociarse en el interior de la célula todavía no se ha investigado. Para determinar si μ NS es capaz de interactuar consigo misma dentro de la célula, usamos el sistema del doble híbrido adaptado a células de mamífero (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia). Para ello, la secuencia codificante de μ NS se clonó en el plásmido pVP16 (para expresar μ NS fusionada al dominio de activación VP16), y en el plásmido pM (para expresar μ NS fusionada al dominio de unión a DNA, GAL4). Ambos plásmidos recombinantes se usaron para transfectar células Cos-7, junto con el plásmido reportero de la luciferasa, pG5luc. Las células se lisaron a las 48 h post-transfección y la actividad de la luciferasa presente en los extractos celulares se midió con un luminómetro. La actividad de luciferasa en los extractos de las células transfectadas con los dos plásmidos que expresan μ NS fue mucho mayor que la del control positivo del kit (Figura 17A, comparar líneas 1 y 3) y que la del resto de los controles negativos (ver materiales y métodos, Figura 17A), lo que demuestra que los monómeros de μ NS se asocian fuertemente en el interior de la célula para formar homo-oligómeros, al menos dímeros.

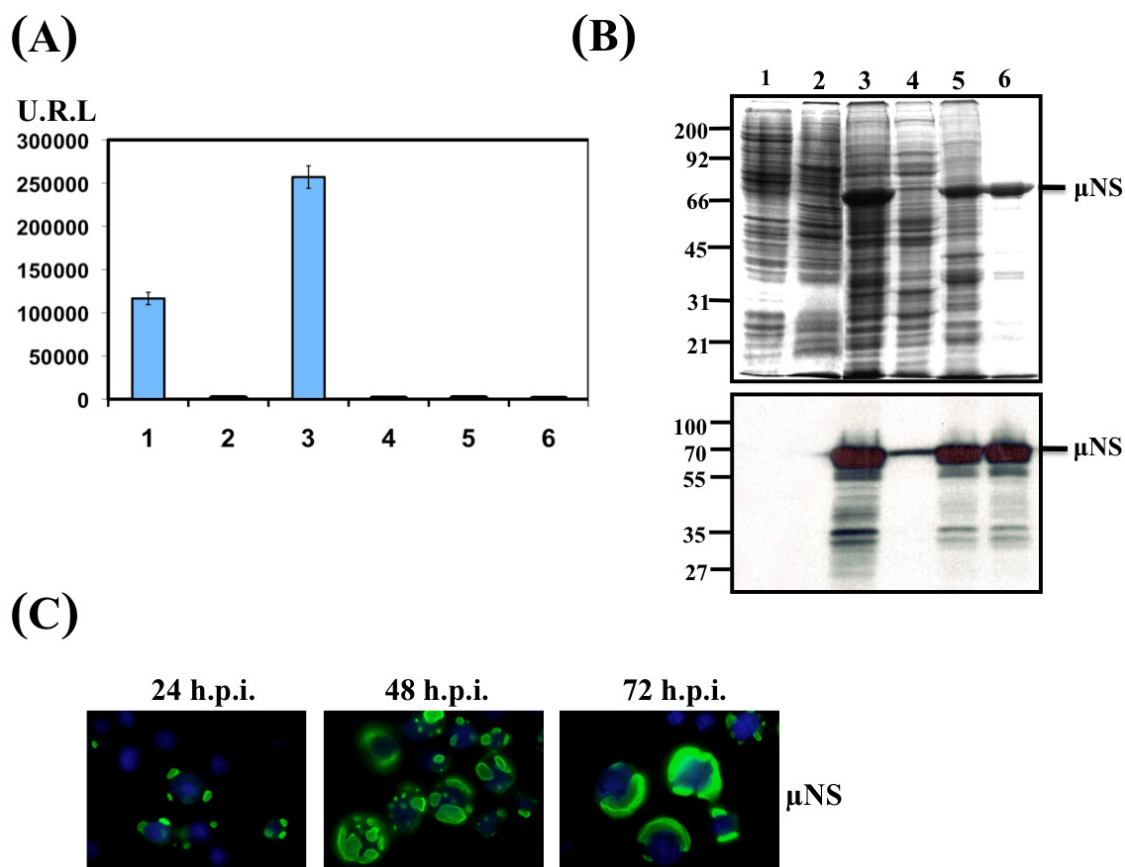


Figura 17. Ensayo del doble híbrido, y expresión y purificación de las inclusiones formadas por μ NS en células de insecto. A- Análisis de la interacción de μ NS mediante el ensayo de doble híbrido adaptado a células de mamífero (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia). Las barras representan los niveles de luciferasa presentes en extractos de células Cos-7 transfectadas con las siguientes combinaciones de plásmidos: 1- control positivo incluido en el kit (ver materiales y métodos); 2- plásmidos vacíos que expresan el dominio de activación y dominio de unión a DNA junto con el plásmido del gen de la luciferasa; 3- plásmidos que expresan μ NS fusionada al dominio de unión a DNA y al dominio de activación, junto con el plásmido de la luciferasa; 4- plásmido que expresa μ NS fusionada al dominio de activación y plásmido vacío correspondiente al dominio de unión a DNA, junto con el plásmido de la luciferasa; 5- plásmido que expresa μ NS fusionada al dominio de unión a DNA y el plásmido vacío correspondiente al dominio de activación, junto con el plásmido de la luciferasa; 6- células sin transfectar. Las Unidades Relativas de Luz (U.R.L.) se indican a la izquierda del diagrama. B- Expresión, purificación y análisis por Western-blot de las inclusiones de μ NS purificadas. Células de insecto Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante que expresa μ NS se lisaron en tampón hipotónico a las 72 h, y el extracto resultante (carril 3) se fraccionó por centrifugación en pellet y sobrenadante (en el carril 4 se muestra el sobrenadante). Posteriormente, el pellet se lavó dos veces en tampón hipotónico, se resuspendió en el mismo volumen de tampón hipotónico y se sonicó. El extracto sonicado (carril 5) se centrifugó y el pellet resultante se lavó 5 veces en tampón hipotónico antes de cargarlo en el gel (carril 6). En el carril 1 y 2 se muestran extractos de células Sf9 sin infectar e infectadas con el baculovirus salvaje, respectivamente. Todas las muestras se resolvieron en un gel del 10% de SDS-poliacrilamida y las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (panel de arriba). La posición de la proteína μ NS recombinante se indica a la derecha y la de los marcadores de peso molecular a la izquierda. Las muestras de cada uno de los pasos de la purificación se analizaron mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra μ NS (paneles de abajo). C- Análisis de la distribución subcelular de μ NS en células de insecto a diferentes tiempos post-infección. Monocapas semiconfluentes de células Sf9 se infectaron con el baculovirus recombinante que expresa μ NS. Las células se fijaron a los tiempos post-infección indicados encima de los paneles y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos policlonales contra μ NS. Las células se tiñeron como en la figura 15.

Para explorar la posibilidad de que alguna proteína celular participe en la formación de las inclusiones que forma μ NS, tratamos de poner a punto un protocolo para purificar esas estructuras con el fin de examinar su contenido proteico. Para maximizar la expresión de μ NS y la producción de inclusiones empleamos el sistema de baculovirus/células de insecto, y la expresión de μ NS se analizó mediante SDS-PAGE y Western-blot. Como se muestra en la figura 17B, se detectó una proteína mayoritaria de 70 kDa en extractos de células infectadas con el baculovirus recombinante (carril 3, panel de arriba), pero no en los de células sin infectar (carril 1, panel de arriba), ni en los de células infectadas con el baculovirus salvaje (carril 2, panel de arriba). Esto, y el hecho de esta proteína fuese reconocida por anticuerpos contra μ NS (Figura 17B, panel de abajo, línea 3), demuestra que la proteína de 70 kDa es μ NS. El análisis mediante inmunofluorescencia de células de insecto infectadas con el baculovirus recombinante, puso de manifiesto que la proteína formaba inclusiones, las cuales son claramente visibles a las 24 h. post-infección (Figura 17C, panel de la izquierda). A tiempos de infección mayores las inclusiones se hacen menos numerosas y más grandes, llegando a ocupar la mayor parte del citosol; a las 48 y 72 h. post-infección algunas células muestran una única inclusión enorme alrededor del núcleo que ocupa casi todo el citoplasma (Figura 17C, panel del medio y de la derecha). Estos resultados demuestran que la capacidad de μ NS para formar inclusiones es independiente de factores específicos de tipo celular, ya que es capaz de formar inclusiones cuando se expresa en células de insecto, de mamífero (Tourís-Otero et al., 2004a) o aviares, y mediante diferentes sistemas de expresión (infección con reovirus aviar o con baculovirus recombinante, y transfección con plásmidos de expresión).

Para determinar la composición proteica de las inclusiones las purificamos evitando el uso de altas concentraciones de sal y de detergentes para poder preservar su estructura, tal y como se describe en la leyenda de la figura 17 (ver también materiales y métodos). La tinción con azul de Coomassie del gel mostrado en la figura 17B puso de manifiesto que la proteína recombinante μ NS es la proteína más abundante en las inclusiones purificadas (Figura 17B línea 6, panel de arriba). Además, la mayoría de las proteínas contaminantes, que en el gel aparecen como bandas débiles por debajo de μ NS, eran reconocidas por los anticuerpos contra μ NS, lo que sugiere que son productos de degradación de μ NS (Figura 17B línea 6, panel de abajo). Estos resultados indican que μ NS es el principal componente de las inclusiones que genera esta proteína en células de insecto.

3. IDENTIFICACIÓN DE LA REGIÓN MÍNIMA DE μ NS QUE RETIENE LA CAPACIDAD PARA FORMAR INCLUSIONES

Si las inclusiones se generan fundamentalmente por interacciones entre monómeros de μ NS, cada monómero debería contener varios dominios de interacción, cada uno de los cuales debería contribuir a la formación de los cuerpos de inclusión. Para identificar los dominios de μ NS que son necesarios para la formación de inclusiones, se construyeron plásmidos que expresaban mutantes con deleciones en los extremos N- y C-terminal de μ NS (ver materiales y métodos). Esos mutantes se usaron para transfectar monocapas de células CEF, y la identidad de cada construcción se verificó mediante secuenciación y Western-blot (datos no mostrados). La capacidad de los mutantes para formar inclusiones citoplasmáticas se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta, usando anticuerpos policlonales contra μ NS. También se usaron anticuerpos contra conjugados de ubiquitina y vimentina para discriminar entre inclusiones y agregados de proteínas (algunos ejemplos relevantes se muestran en la Figura 20).

En primer lugar probamos las deleciones del extremo C-terminal que se indican en la Figura 18. Sorprendentemente, ninguna de las deleciones C-terminales formaba cuerpos de inclusión, sino que se distribuían de forma difusa por toda la célula. Estos resultados indican que las secuencias del extremo C-terminal de μ NS son imprescindibles para la formación de inclusiones. Por otra parte, ninguno de los mutantes parecía formar agregados o agresomas, ya que no colocalizaban con conjugados de ubiquitina ni inducían redistribución de vimentina (datos no mostrados).

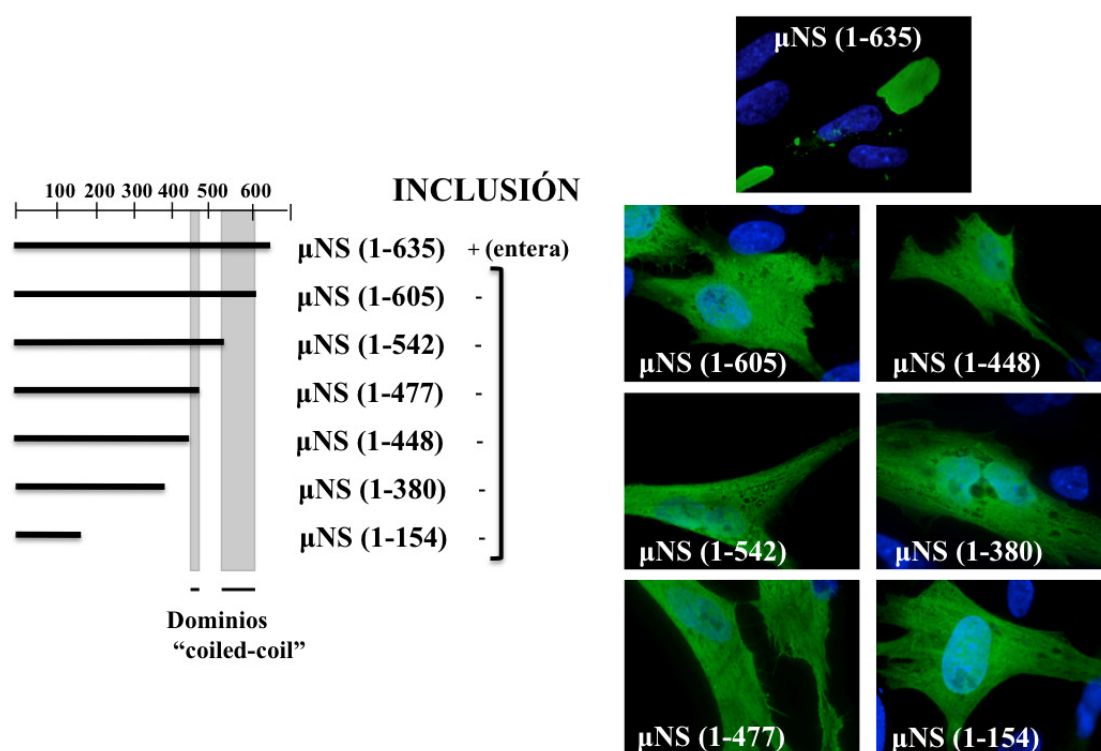


Figura 18. Distribución intracelular de μ NS y de sus mutantes de deleción C-terminal. La proteína μ NS está representada esquemáticamente por una línea horizontal negra que abarca los residuos 1-635 (posiciones numeradas arriba y a la derecha). Los mutantes de μ NS se muestran como líneas negras horizontales que abarcan aproximadamente la porción de μ NS que representan. Los dominios "coiled-coil" están representados como barras grises dispuestas verticalmente. La capacidad de cada mutante para formar inclusiones citoplasmáticas se indica como positivo (+) o negativo (-). A la derecha de la figura se muestran imágenes representativas de las inmunofluorescencias obtenidas de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las deleciones C-terminal de μ NS mostradas a la derecha del esquema. Las células se fijaron a las 18 h post-transfección y se tiñeron como se indica en la figura 15.

Posteriormente analizamos la importancia de las secuencias N-terminales de μ NS (Figura 19). Los mutantes a los que se les retiraba hasta 154 aminoácidos, continuaban formando cuerpos de inclusión con una morfología similar a las que formaba la μ NS salvaje (Figura 19, comparar paneles 1 y 3), lo que sugiere que estos residuos no son necesarios para formar inclusiones. Sin embargo, los mutantes a los que se les retiraba 380, 420 y 447 aminoácidos formaban inclusiones más pequeñas y redondeadas que las formadas por la μ NS salvaje, por μ NS(127-635), por μ NS(140-635) o por μ NS(155-635) (Figura 19, comparar los paneles 5 con los paneles 1 y 3). Ninguna de esas delecciones co-localizaban con conjugados de ubiquitina ni inducían redistribución de vimentina (Figura 20A y 20B, paneles 1 y 3). Estos resultados sugieren que la región que comprende los residuos 155 a 380 de μ NS contienen secuencias que controlan la morfología y el tamaño de los cuerpos de inclusión. A diferencia de los mutantes mencionados arriba, los mutantes μ NS(84-635), μ NS(112-635), μ NS(208-635), μ NS(271-635) formaban estructuras con aspecto irregular sugiriendo que eran agregados proteicos (Figura 19, paneles 2 y 4), lo que se comprobó al observar que eran reconocidas por anticuerpos contra conjugados de ubiquitina en la mayoría de las células (Figura 20B panel 2), aunque no estaban rodeadas por jaulas de vimentina (Figura 20A, panel 2). Finalmente, los mutantes a los que se les retiraba más de 447 aminoácidos del extremo amino no fueron capaces de formar inclusiones, distribuyéndose de forma difusa por toda la célula (Figura 19, paneles 6). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, llegamos a la conclusión de que la región mínima con capacidad para formar inclusiones comprende los residuos 448 a 635 de μ NS, por lo que denominamos μ NS-Mi a esa región.

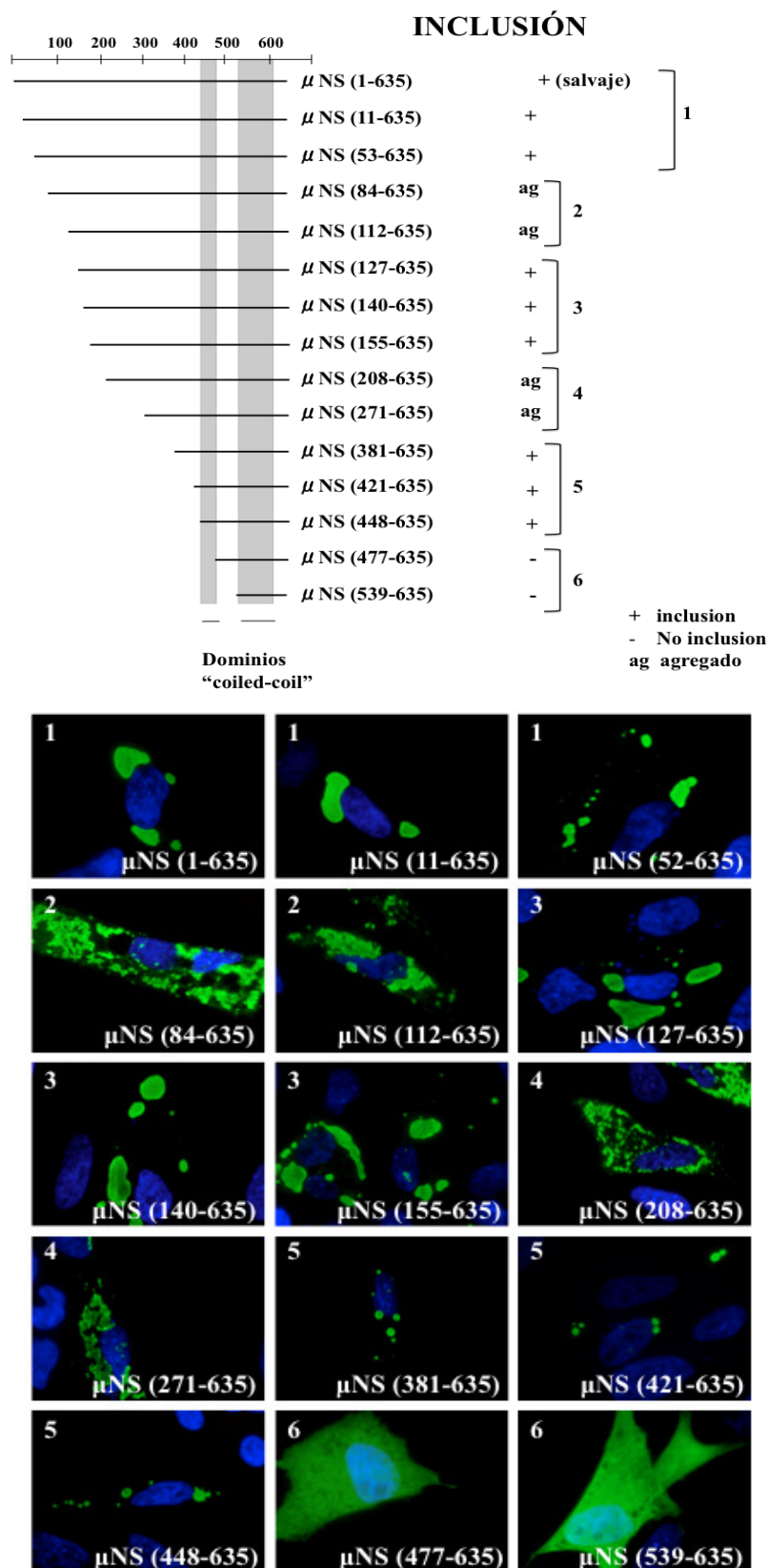
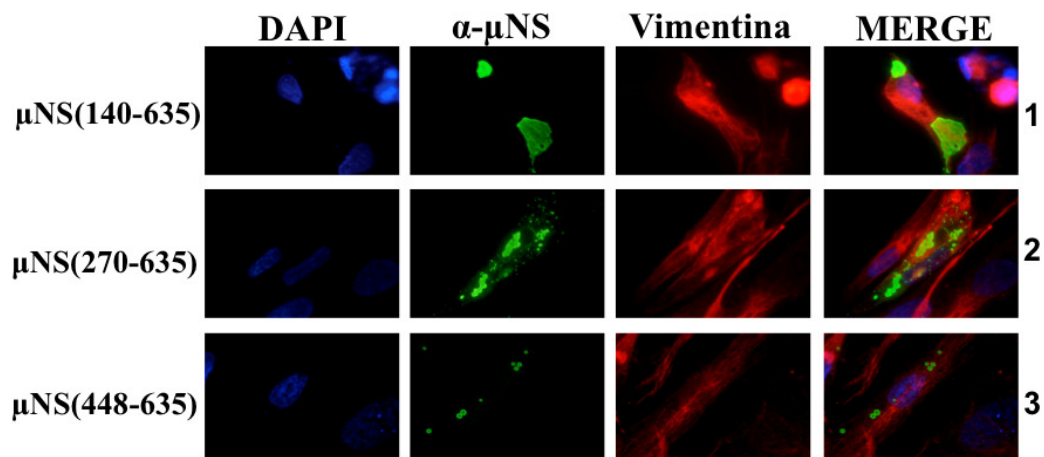


Figura 19. Distribución intracelular de μ NS y de sus mutantes de delección N-terminal. La proteína μ NS, así como sus mutantes, están representados siguiendo las mismas reglas que para la figura 18. La capacidad de cada mutante para formar inclusiones citoplasmáticas se indica como positivo (+), negativo (-) o agregados (ag). Abajo de la figura se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia de células CEF transfectadas con plásmidos que expresan las versiones deleccionadas de μ NS que corresponden a los números indicados a la derecha del esquema. Las células se fijaron a las 18 h post-

transfección y se tiñeron como se indica en la figura 15. Los números que se muestran a la derecha del esquema relacionan los subgrupos del esquema con las fotos que se muestran debajo.

(A)



(B)

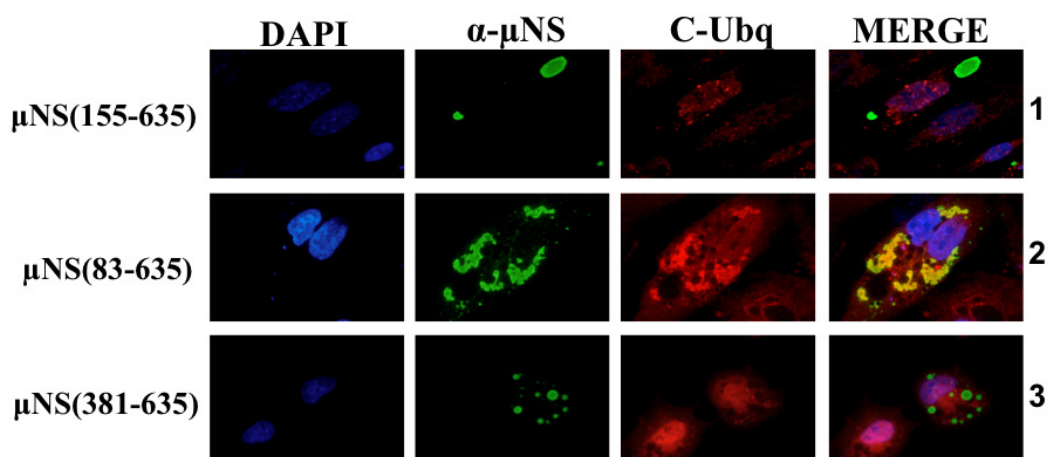


Figura 20. Análisis mediante inmunofluorescencia de las delecciones N-terminales de μNS, con anticuerpos contra μNS, vimentina y conjugados de ubiquitina. A- Monocapas semiconfluentes de células CEF se transfectaron con plásmidos que expresan: μNS(140-635), μNS(270-635), y μNS(448-635) como ejemplos de inclusiones grandes, agregados e inclusiones pequeñas, respectivamente. Las células se fijaron a las 18 h. post-transfección y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra μNS (verde), y con un anticuerpo monoclonal contra vimentina (rojo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. B- Igual que en A, pero en este caso las células se transfectaron con: μNS(155-635), μNS(112-635); o μNS(381-635) como ejemplos de inclusiones grandes, agregados o inclusiones pequeñas, respectivamente. Las células se fijaron a las 18 h post-transfección y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra μNS (verde), y un anticuerpo monoclonal contra conjugados de ubiquitina (rojo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

Como en el caso de la proteína entera, μNS-Mi formaba inclusiones globulares en células de insecto cuando se expresa con un baculovirus recombinante (Figura 21C),

y además estas inclusiones se pudieron purificar fácilmente siguiendo el mismo protocolo de purificación que para la μ NS entera. El análisis de su composición proteica mediante SDS-PAGE puso de manifiesto que las inclusiones purificadas contenían fundamentalmente μ NS-Mi (Figura 21B). Sin embargo, a pesar de que el nivel de expresión de μ NS-Mi en células de insecto fue similar al de μ NS, las inclusiones que forma μ NS-Mi son más pequeñas y redondeadas que las que forma la μ NS entera (comparar Figura 17C y 21C), confirmando nuestra anterior observación de que residuos en la región 155-380 controlan el tamaño y morfología de las inclusiones que forma μ NS.

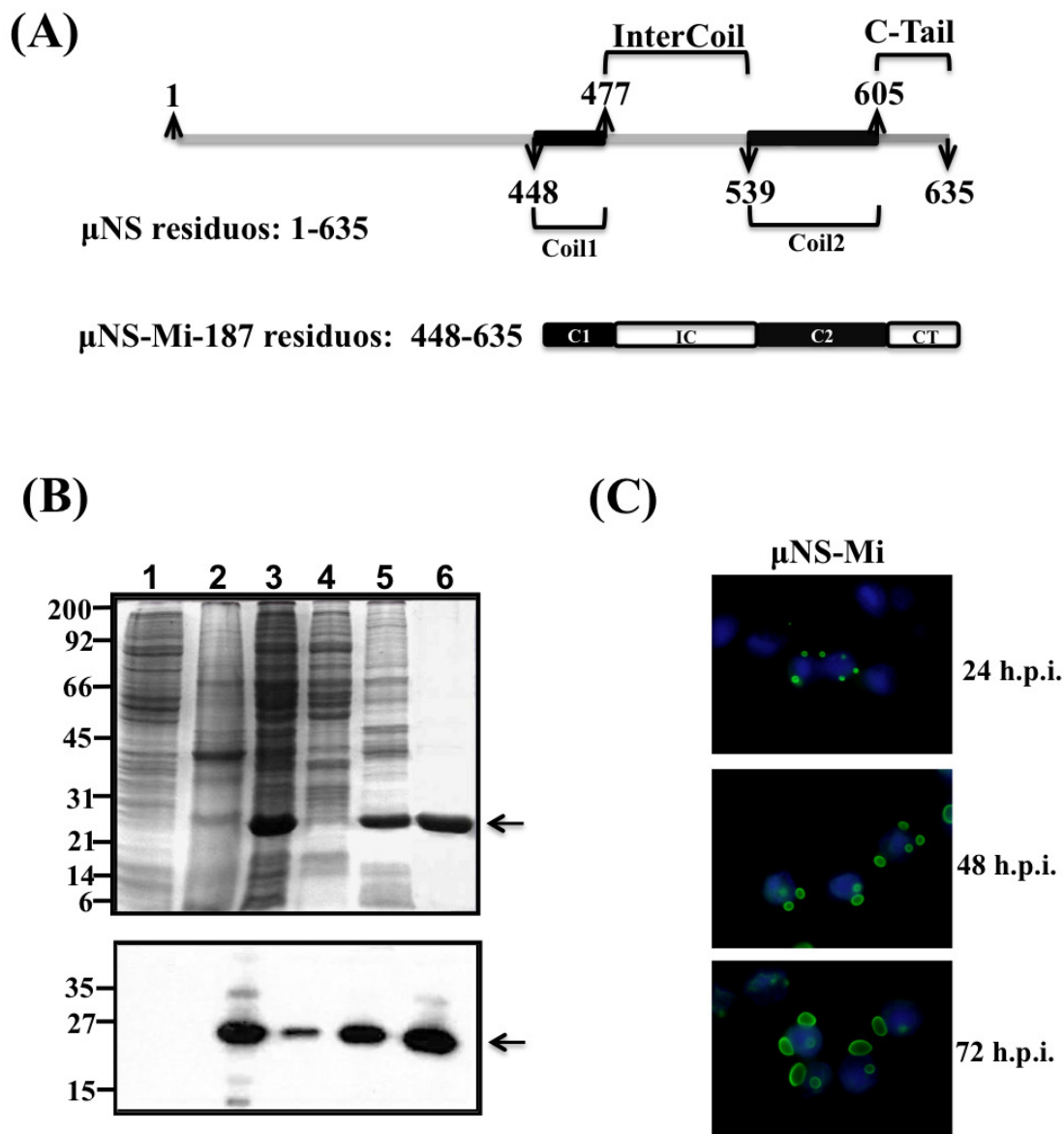


Figura 21. Representación esquemática de las proteínas μ NS y μ NS-Mi, y purificación de las inclusiones de μ NS-Mi generadas en células de insecto. A- La proteína μ NS entera está representada con una línea horizontal gris y abarca los residuos 1-635, los dos segmentos “coiled-coil” detectados con el programa Coils (Lupas *et al.*, 1991; 1996) se indican con dos barras horizontales negras (Coil 1 o C1 (448-477) y Coil 2 o C2 (539-605)); la región Intercoil (IC) abarca los residuos 477-539; y la cola C-terminal (CT) los residuos 605-635. La región mínima de μ NS con capacidad de formar inclusiones (μ NS-Mi) comprende los residuos 448 a 635. Los cuatro dominios constituyentes de μ NS-Mi están representados como rectángulos (Coil 1 o C1; el Intercoil o IC; el Coil 2 o C2 y la C-tail o CT). B- Expresión, purificación y Western-blot de inclusiones de μ NS-Mi purificadas. La expresión y purificación de la inclusiones de μ NS-Mi se realizó tal y como se indica en la leyenda de la figura 17B. Todas las muestras se resolvieron en un gel del 12,5% de SDS-poliacrilamida y las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (panel de arriba). La posición de la proteína μ NS-Mi recombinante se indica a la derecha y la de los marcadores de peso molecular a la izquierda. Las muestras de cada uno de los pasos de la purificación se analizaron mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra μ NS (paneles de abajo). C- Análisis de la distribución subcelular de μ NS-Mi en células de insecto a diferentes tiempos post-infección. Monocapas semiconfluentes de células Sf9 se infectaron con el baculovirus recombinante que expresa μ NS-Mi. Las células se fijaron a los tiempos post-infección indicados a la derecha de los paneles, y se tiñeron como se indica en la figura 15.

3.1. Identificación de los dominios de μ NS implicados en la formación de inclusiones

El análisis bioinformático de la secuencia de la proteína μ NS realizado previamente (Tourís-Otero et al., 2004a) y confirmado con el programa Coils reveló la presencia de cuatro dominios diferentes en μ NS-Mi (Figura 21A): dos dominios “coiled-coil” (uno que abarca los aminoácidos 448-477, denominado **Coil 1** o **C1**; y el otro que abarca los residuos 539-605, denominado **Coil2** o **C2**); una región formada por 61 residuos que une los dos “coiled-coil” (denominado **Intercoil** o **IC**); y finalmente una región de 30 aminoácidos que sigue al segundo “coiled-coil”, que comprende los residuos 605-635 (denominado **C-Tail** o **CT**). A continuación, investigamos la implicación de cada uno de estos dominios en la formación de inclusiones.

3.1.1. Dominio Intercoil (IC)

Se ha demostrado que la región Intercoil de la proteína μ NS del reovirus de mamífero contiene un motivo consenso común presente en todas las μ NS homólogas examinadas de diferentes miembros del género *Orthoreovirus* (Broering *et al.*, 2005, Figura 22A). Esta secuencia contiene dos residuos altamente conservados (histidina 570 y cisteína 572), con un alto potencial para quelar metales tales como el Zn. La mutación individual de estos residuos en la proteína μ NS de reovirus de mamífero eliminó por completo su capacidad para formar inclusiones (Broering *et al.*, 2005). Para comprobar si sucedía lo mismo con su homóloga del reovirus aviar, generamos dos versiones de μ NS con mutaciones puntuales en los residuos equivalentes: la histidina 487 y la cisteína 489, las cuales se mutaron a glutamina y a serina, respectivamente (Figura 22A). La expresión de estos mutantes en células transfectadas (Figura 22B) reveló que ambos mutantes, μ NS(H487Q) y μ NS(C489S), se distribuían de forma difusa por todo el citoplasma, demostrándose así que los aminoácidos histidina 487 y cisteína 489 de la μ NS del reovirus aviar también son imprescindibles para formar inclusiones.

(A)

Secuencias conservadas en la región Intercoil de diferentes μ NS de reovirus

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| | 478 | D | H | L | L | A | Y | L | N | E | H | V | C | V | N | A | K | D | H | 495 |
| RVa (12 cepas) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 561 | C | S | L | D | M | Y | L | X | H | H | T | C | I | N | X | H | X | K | 578 |
| RVm (3 cepas) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 560 | Y | S | I | Q | Q | Y | L | H | S | H | T | C | V | N | T | Q | E | L | 577 |
| AqRV (2 cepas) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(B)

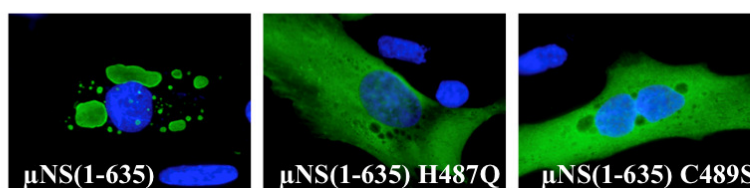


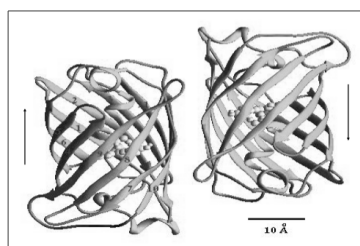
Figura 22. Importancia de la región Intercoil de la μ NS del reovirus aviar. A-Secuencias conservadas dentro de la región Intercoil de μ NS de diferentes reovirus. Las posiciones numéricas se indican a la derecha y a la izquierda de la figura. El motivo consenso se definió mediante comparación de las secuencias de la región Intercoil de diferentes homólogos de μ NS, concretamente 12 cepas de reovirus aviar (RVa), 3 de reovirus de mamífero (RVm) y 2 de aquareovirus (AqRV). Las posiciones conservadas se muestran dentro de rectángulos. Los asteriscos indican los residuos conservados cuya mutación provoca la pérdida del fenotipo de la μ NS del reovirus de mamífero, y que se corresponden con la His487 y Cys489 de la μ NS del reovirus aviar (Figura adaptada de Broering *et al.*, 2005). B- Análisis mediante inmunofluorescencia de células CEF transfectadas con el plásmido que expresa μ NS (1-635) o versiones de μ NS en donde la histidina-487 y la cisteína-489 de la región Intercoil se mutaron a glutamina y serina, respectivamente. Las células se tiñeron igual que para la figura 15.

3.1.2. Dominio Coil 1 (C1)

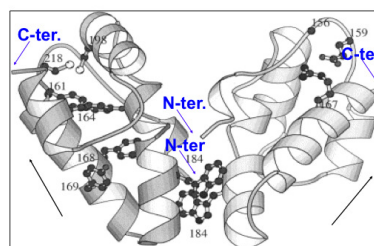
Los resultados de los experimentos indicados en la Figura 19 ya habían demostrado que el Coil1 es imprescindible para formar cuerpos de inclusión, ya que si a μ NS-Mi se le elimina ese dominio se origina el mutante μ NS(477-635), el cual no tiene capacidad para formar inclusiones. Para determinar experimentalmente el papel que juega ese dominio en la formación de cuerpos de inclusión, sustituimos el Coil1 de μ NS-Mi por: i) GFP, ya que en un estudio anterior realizado con la μ NS de reovirus de mamífero se demostró que el primer “coiled-coil” podía ser sustituido por dicha proteína (ver sección de Introducción); ii) el dominio de dimerización C-terminal de la proteína CA de la cápside del VIH (CA-C); y iii) un mutante puntual (W184A) del dominio CA-C, al cual denominamos CA-C-M (Mateu; 2002). Elegimos el dominio CA-C por dos razones: primero, porque es un dímero cuyos monómeros están

orientados de forma diferente a los de GFP. Así, mientras que los monómeros de GFP se orientan de forma anti-paralela en la estructura cristalina del dímero (Yan *et al.*, 1996; Figura 23A), los monómeros de CA-C presentan una orientación paralela en forma de V (Mateu, 2002; Figura 23A). La segunda razón es porque su versión mutada, CA-C-M, tiene su capacidad de dimerización drásticamente reducida y por lo tanto se puede usar como un buen control negativo (Mateu, 2002). La expresión de las proteínas fusionadas en células CEF reveló que el mutante GFP- μ NS(477-635), que tiene sustituido el Coil1 por GFP, sigue formando inclusiones (Figura 23B, panel 3), indicando que GFP es capaz de reemplazar al Coil1 de las μ NS de reovirus aviar y de mamífero. Para confirmar experimentalmente que la capacidad de dimerización de GFP es la responsable de que pueda reemplazar al dominio Coil1, a continuación sustituimos este dominio por CA-C y CA-C-M. La fusión del dominio CA-C al mutante μ NS(477-635) restauró su capacidad para formar inclusiones globulares (Figura 23B, panel 4), mientras que la proteína que tiene fusionado del dominio mutado, CA-C-M, se distribuía de forma difusa por toda la célula transfectada, aunque también se observó la presencia de pequeñas inclusiones dispersas por todo el citoplasma (Figura 23B, panel 5). Estos resultados indican que el Coil1 puede ser sustituido por un dominio de dimerización, sin importar la orientación de los monómeros dentro del dímero, lo que a su vez sugiere que este dominio contribuye a la formación de inclusiones colaborando en la generación de oligómeros basales. Ninguna de las construcciones mostradas en la figura 23B co-localizaba con conjugados de ubiquitina, ni inducía redistribución de vimentina (datos no mostrados).

(A)

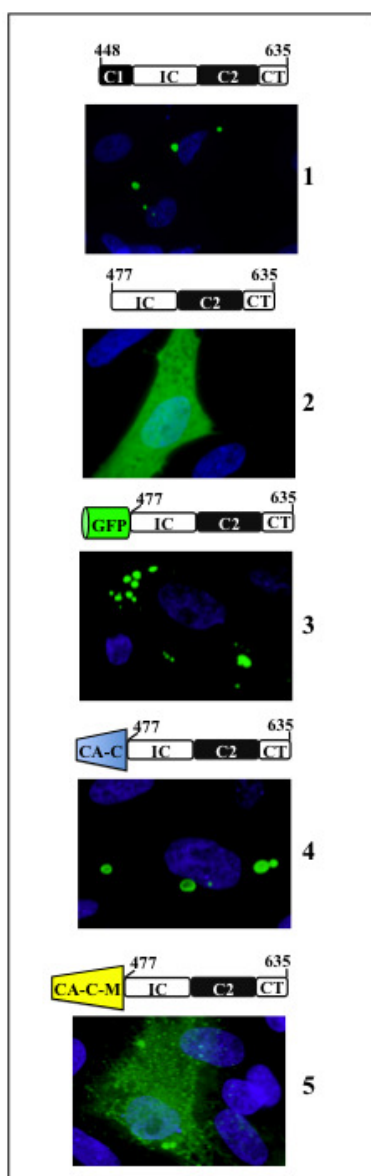


Yang et al., (1996)
Nature Biotechnology 14, 1246-1251



Mateu, M.G. (2002)
J. Mol. Biol. 328, 519-531

(B)



(C)

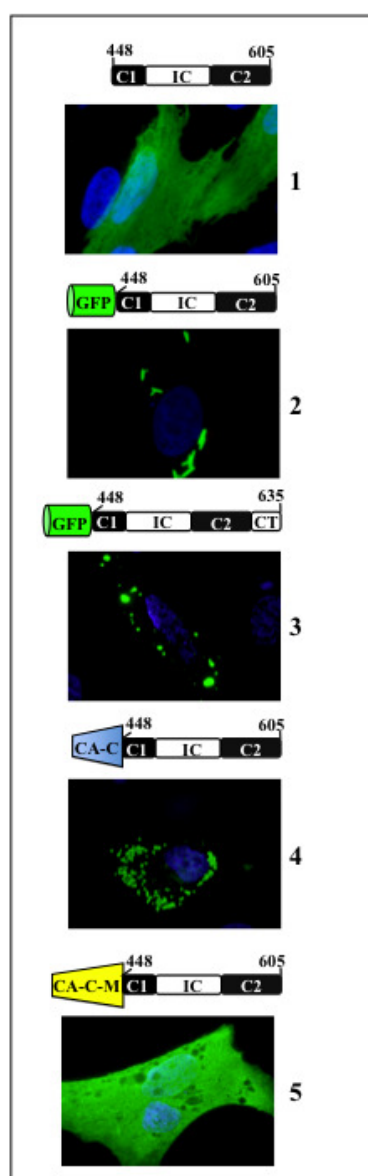


Figura 23. Estructura tridimensional de la proteína GFP y del dominio CA-C, y análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión intracelular de quimeras de μ NS-Mi. A- La estructura tridimensional de GFP así como la orientación de sus monómeros en el dímero se muestra a la izquierda de la figura. A la derecha se muestra la estructura de CA-C y la orientación de sus monómeros en el dímero. B y C- Monocapas semiconfluentes de CEF se transfectaron con plásmidos que expresan μ NS-Mi

(B1) y las diferentes construcciones indicadas encima de cada fotografía. Los cuatro dominios presentes en μ NS-Mi están representados siguiendo el esquema de la figura 21. El barril verde representa la proteína fluorescente verde, GFP. CA-C es el dominio C-terminal de la proteína CA de la cápside del VIH y CA-C-M es el mismo dominio con una mutación puntual que inhibe drásticamente su capacidad de dimerización. Las células transfectadas se analizaron por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra μ NS (verde), excepto las que contienen GFP que se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. B-Sustitución del Coil1 o C1. C-Sustitución del dominio C-tail o CT.

3.1.3. Dominio C-Terminal (C-Tail)

Los resultados mostrados en la Figura 18 demuestran que la región C-tail, μ NS(605-635), es necesaria para formar inclusiones ya que su delección provoca la pérdida del fenotipo. Para entender mejor el papel que juega esta región en la formación de inclusiones, decidimos comprobar si se podría sustituir por dominios de dimerización, al igual que con C1. Cuando a μ NS-Mi se le elimina el C-tail para generar μ NS(448-605), deja de formar inclusiones (Figura 23C, panel 1), indicando que la región que contiene los dos “coiled-coil” y la región Intercoil no es suficiente para generarlas, y confirmando que el C-tail es imprescindible. Para intentar determinar si el C-tail puede ser reemplazado por un dominio de dimerización, fusionamos GFP al extremo C-terminal del mutante μ NS(448-605), pero lamentablemente la construcción generada co-localizaba con conjugados de ubiquitina, sugiriendo que formaba agregados proteicos (datos no mostrados). Sin embargo, las proteínas resultantes de fusionar cualquiera de los tres dominios diméricos al extremo amino de μ NS(448-605), no co-localizaban con conjugados de ubiquitina ni inducían redistribución de vimentina (datos no mostrados), por lo que se usaron para analizar su capacidad formadora de inclusiones. Cuando la GFP se fusionó al extremo amino de μ NS(448-605) se recuperaba el fenotipo formador de inclusiones, pero sorprendentemente las inclusiones formadas por esta construcción (GFP-C1-IC-C2) tienen morfología tubular (Figura 23C, panel 2), en vez del típico aspecto globular que tienen las inclusiones que forman los otros mutantes probados hasta el momento.

Para determinar si la presencia de GFP es responsable del fenotipo tubular, reemplazamos GFP por CA-C o CA-C-M. La sustitución por CA-C, originó inclusiones con forma globular (Figura 23C, panel 4), mientras que la sustitución por su versión mutada CA-C-M dio lugar a una quimera que se distribuía de forma difusa por toda la

célula (Figura 23C, panel 5). Estos resultados indican que: i) la orientación de los contactos monómero-monómero en los dímeros es importante en la formación y morfología de las inclusiones; ii) la región C-tail probablemente está implicada en tal orientación, ya que el fenotipo de las inclusiones es dependiente del dominio de dimerización que sustituye al C-tail. Para confirmar esta última observación, y teniendo en cuenta que los dominios se habían fusionado al extremo amino de μ NS-Mi, cuando la C-tail está localizada en el extremo carboxilo, decidimos reinsertarle la C-tail a la construcción GFP- μ NS(448-605) que forma estructuras tubulares. La nueva quimera, GFP- μ NS(448-635) (GFP-C1-IC-C2-CT) pasaba a formar inclusiones globulares (Figura 23C, panel 3), confirmando que el C-tail es dominante sobre GFP y que está directamente implicada en la orientación de los contactos entre monómeros de μ NS. Esta hipótesis está apoyada por nuestras observaciones de que la pérdida del C-tail conduce a la pérdida del fenotipo (Figura 18), y de que la morfología de las inclusiones es dependiente de la orientación que tienen los monómeros en el dominio de dimerización que sustituye al C-tail.

Teniendo en cuenta la forma inusual de las inclusiones tubulares y la presencia de los epitopos exógenos CA-C y GFP, existe la posibilidad de que alguna proteína celular sea reclutada a las inclusiones formadas por las quimeras descritas anteriormente, enmascarando la verdadera implicación de GFP, CA-C y de los dominios individuales de μ NS-Mi, en la construcción y orientación de las inclusiones. Para resolver esta cuestión, generamos los baculovirus recombinantes que expresan las dos construcciones quiméricas: GFP- μ NS(448-605) y CA-C- μ NS(448-605), y analizamos la forma y el contenido proteico de las inclusiones que forman estas construcciones en células de insecto. Al igual que en células CEF transfectadas, la expresión de GFP- μ NS(448-605) en células de insecto originó inclusiones tubulares fluorescentes, fácilmente visibles con los microscopios óptico y de fluorescencia (Figura 24A, paneles de arriba), indicando que GFP está plegada correctamente en la proteína quimérica. Además, estas inclusiones, cuya longitud parece estar limitada únicamente por el tamaño de la célula, eran más gruesas que las producidas en células CEF transfectadas (comparar panel 2 de Figura 23C, con los paneles superiores de la Figura 24A). Esto probablemente refleja la mayor eficiencia de expresión del sistema baculovirus/células de insecto, lo que sugiere que el tamaño de los tubos está controlado por la concentración intracelular de la proteína. Estas inclusiones se purificaron siguiendo el

mismo protocolo que el descrito para μ NS. El análisis mediante SDS-PAGE reveló que los tubos estaban compuestos fundamentalmente por una proteína de 45 kDa (Figura 24B, carril 6, paneles de arriba), que mediante Western-blot, usando anticuerpos contra μ NS, se demostró que se trataba de GFP- μ NS(448-605) (masa molecular teórica 46,4 kDa) (Figura 24B, carril 6, paneles de abajo). Por otra parte, CA-C- μ NS(448-605) expresada en células de insecto generó inclusiones globulares citoplasmáticas, que se visualizaban fácilmente con el microscopio óptico y también mediante inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales contra μ NS (Figura 24A, paneles de abajo). Las inclusiones purificadas contenían mayoritariamente una proteína de 30 kDa (Figura 24C, carril 6, paneles de arriba), que fue reconocida por anticuerpos contra μ NS (Figura 24C, carril 6, paneles de abajo), indicando que esa proteína es CA-C- μ NS(448-605) (masa molecular teórica 28,2 kDa) y sugiriendo que las inclusiones están formadas fundamentalmente por esta proteína. El hecho de que la proteína μ NS expresada en células de insecto forma inclusiones que ocupan la mayor parte del citosol celular (Figura 17C), mientras que μ NS-Mi y CA-C- μ NS(448-605) forman inclusiones redondeadas más pequeñas, apoya nuestra observación anterior de que la región que abarca los residuos 155 a 380, interviene en la maduración de las inclusiones.

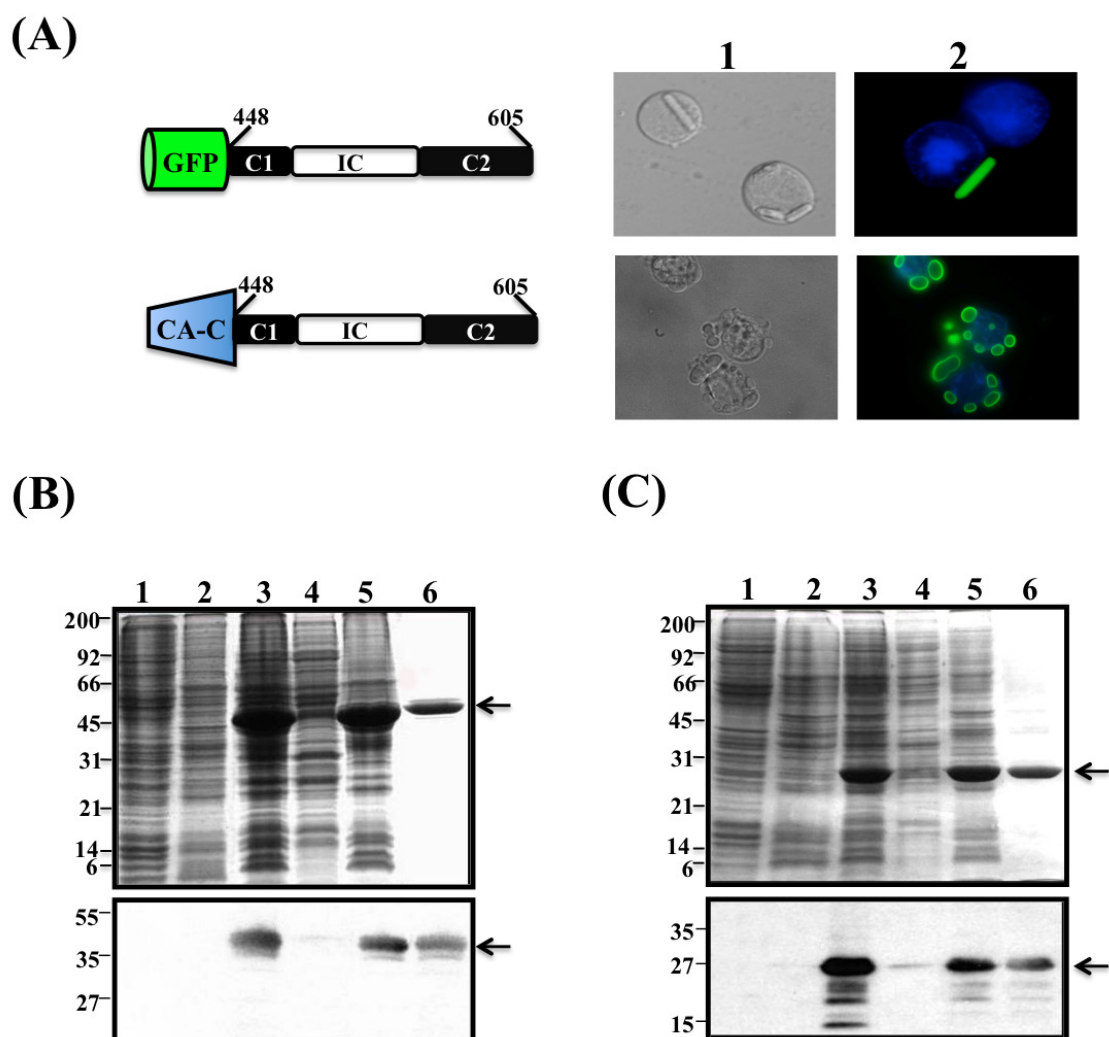


Figura 24. Expresión y purificación de las quimeras de μ NS-Mi en células de insecto. A- Células Sf9 se infectaron con los baculovirus que expresan las quimeras representadas a la izquierda de la figura. Tres días después de la infección las células se fijaron y los núcleos se tiñeron con DAPI (panel de arriba derecha) o con DAPI y anticuerpos contra μ NS (panel de abajo derecha) y se fotografiaron usando DIC ("Differential interference contrast") (1) y un microscopio de fluorescencia (2). B- Expresión, purificación y análisis mediante Western-blot de las inclusiones tubulares (GFP-C1-IC-C2). La expresión y purificación de la inclusiones de GFP-C1-IC-C2 se realizó tal y como se indica en la leyenda de la figura 17B. Todas las muestras se resolvieron en un gel del 12,5% de SDS-poliacrilamida y las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (panel de arriba). La posición de la proteína GFP-C1-IC-C2 recombinante se indica a la derecha y la de los marcadores de peso molecular a la izquierda. Las muestras de cada uno de los pasos de la purificación se analizaron mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra μ NS (paneles de abajo). C- Expresión, purificación y análisis mediante Western-blot de las inclusiones globulares (CA-C-C1-IC-C2). La expresión y purificación de las inclusiones globulares se realizó del mismo modo que en B. La posición de la proteína CA-C-C1-IC-C2 recombinante se indica a la derecha y la de los marcadores de peso molecular a la izquierda. Las muestras de cada uno de los pasos de la purificación se analizaron mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra μ NS (paneles de abajo).

Los resultados mostrados en la figura 23C indican que el dominio C-tail está directamente implicado en la orientación de los contactos entre monómeros de μ NS, evitando interacciones al azar que conducirían a una disminución en la eficiencia de formación de inclusiones. Si esto es cierto, algunas de las delecciones C-terminales que carecen de la región C-tail, mostradas en la figura 18, formarían cuerpos de inclusión al fusionarles un dominio de dimerización que guiara los contactos entre monómeros de μ NS. Para analizar esta cuestión, fusionamos GFP a los extremos amino y carboxilo de las delecciones C-terminales de μ NS que no tienen capacidad para formar inclusiones. Previamente, y para comprobar que la fusión de GFP no inhibe la capacidad formadora de inclusiones de la μ NS salvaje, generamos plásmidos que expresan GFP fusionada a sus extremos N- y C-terminales. Los resultados, descritos en las figuras 25A y 25B indican que: i) GFP no afecta a la capacidad de μ NS para formar inclusiones (Figura 25A y 25B, paneles numerados 1); ii) GFP es capaz de sustituir al dominio C-tail de μ NS, independientemente del extremo al que se fusione (Figura 25A y 25B, paneles numerados 2). Estos resultados confirman nuestra conclusión previa de que el dominio C-tail juega un papel clave en la orientación de los contactos entre los monómeros de μ NS dando lugar a la formación de oligómeros basales correctamente orientados. Finalmente, la fusión de GFP a mutantes de μ NS a los que les faltan regiones mayores que la C-tail no fue capaz de restaurar la capacidad para formar inclusiones (Figura 25A y 25B, paneles numerados 3). Ninguna de las construcciones mostradas en la figura 25B co-localizan con conjugados de ubiquitina ni inducen redistribución de vimentina (datos no mostrados).

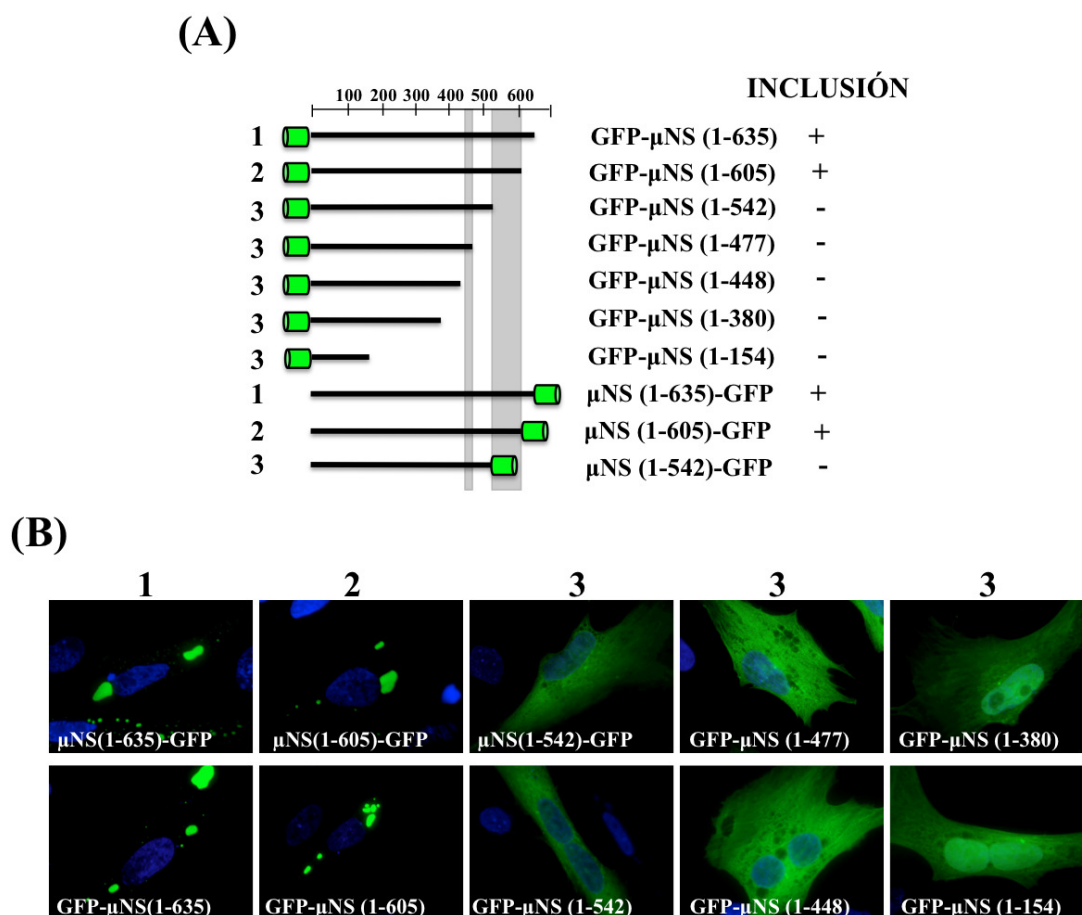


Figura 25. Distribución intracelular de μNS y de mutantes delecionados en la región C-terminal fusionados a GFP. A- La proteína μNS, así como sus mutantes, están representados siguiendo las mismas reglas que para la figura 18. La capacidad de cada mutante para formar inclusiones citoplasmáticas se indica como positivo (+) o negativo (-). La presencia de GFP se representa como un barril verde y se indica a la derecha de la figura. A la izquierda del esquema se muestran números que se corresponden con los indicados en B. B- Imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las quimeras indicadas en la figura. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

3.1.4. Dominio Coil 2 (C2)

Para determinar si el Coil2 de μNS-Mi también se puede sustituir por dominios diméricos, generamos el plásmido recombinante que expresa GFP fusionada al extremo amino del mutante μNS(448-542), el cual carece del Coil2 y de la región C-tail (Figura 26A, 2). El análisis mediante microscopía de fluorescencia de células CEF que expresan la quimera GFP-μNS(448-542) puso de manifiesto que dicha construcción se distribuye de forma difusa por todo el citoplasma (Figura 26B, panel 2), indicando que la presencia de una proteína dimérica no puede sustituir la ausencia conjunta del Coil2 y C-tail. Por otro lado, el hecho de que GFP-μNS(448-605), que carece de la región C-

tail, forma inclusiones pero GFP- μ NS(448-542), que carece de C-tail y Coil2, no lo hace, sugiere que el Coil2 también contiene algún dominio de interacción necesario para formar inclusiones (Figura 26B, comparar panel 1 y 2).

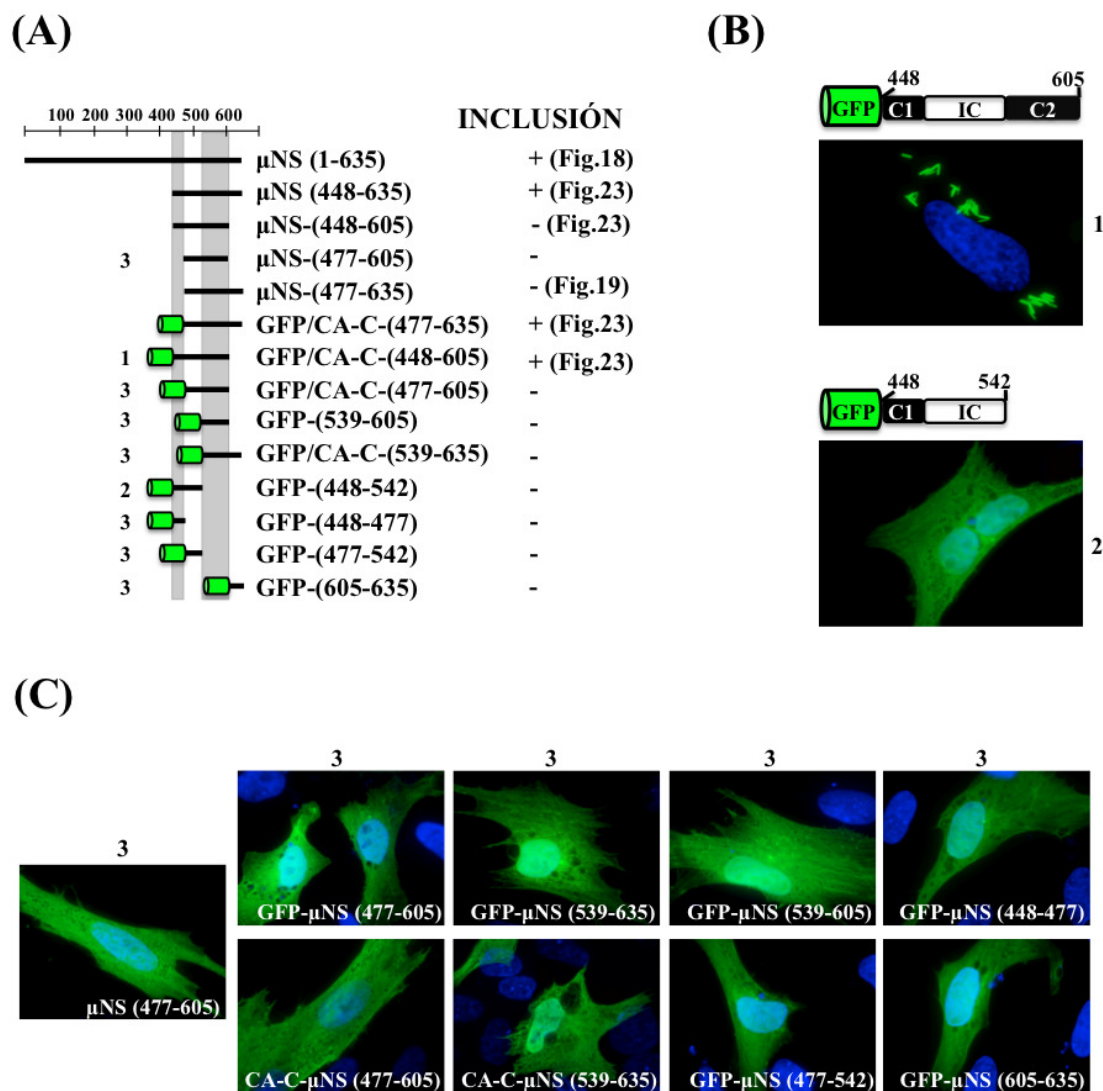


Figura 26. Representación esquemática de diferentes mutantes de delección de μ NS y de sus fusiones con GFP y CA-C, y análisis de su expresión. A- La proteína μ NS, así como sus mutantes de delección, fusionados con GFP o CA-C están representados siguiendo las mismas reglas que para las figuras 18 y 25. La capacidad de cada mutante para formar inclusiones citoplasmáticas se indica como positivo (+) o negativo (-). La presencia de GFP o CA-C se representa como un barril verde y se indica a la derecha de la figura. A la izquierda del esquema se muestran números que se corresponden con los indicados en B y C. B- Imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las quimeras representadas encima de las figuras. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. C- Imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las quimeras indicadas en la figura. Las células transfectadas se analizaron por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra μ NS (verde), excepto las que contienen GFP que se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

Para identificar la región mínima de μ NS capaz de formar inclusiones cuando tiene fusionados dominios diméricos, se construyeron los plásmidos que se describen en la figura 26A, los cuales expresan diversas versiones deleccionadas de μ NS-Mi fusionadas al extremo carboxilo de GFP o CAC-C. El análisis de la expresión de estas construcciones con un microscopio de fluorescencia (Figura 26C) reveló que se distribuían de forma uniforme por toda la célula, lo que sugiere que los mutantes μ NS(448-605) y μ NS(477-635) son las regiones mínimas de μ NS capaces de formar cuerpos de inclusión cuando tienen fusionados dominios de dimerización en su extremo amino (Figura 26B panel 1 y Figura 23B, panel 3 y 4).

4. IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DE μ NS QUE SON RECLUTADAS ESPECÍFICA Y EFICIENTEMENTE A LAS INCLUSIONES DE μ NS

Para continuar con la caracterización de la actividad formadora de inclusiones de aquellas regiones de μ NS que no forman inclusiones por sí solas, co-expresamos μ NS y cada una de esas regiones, y analizamos la capacidad de cada región para incorporarse a las inclusiones que forma la proteína μ NS entera. Para realizar este apartado dividimos inicialmente la proteína μ NS en 5 regiones, basándonos en los resultados obtenidos en las anteriores secciones (Figura 27A). Dichas regiones o dominios son: i) región N-terminal (residuos 1-448, región 1); ii) Coil1 o C1 (residuos 448-477, región 2); iii) Intercoil o IC (residuos 477-542, región 3); iv) Coil2 o C2 (residuos 539-605, región 4); y v) C-Tail o CT (residuos 605-635, región 5).

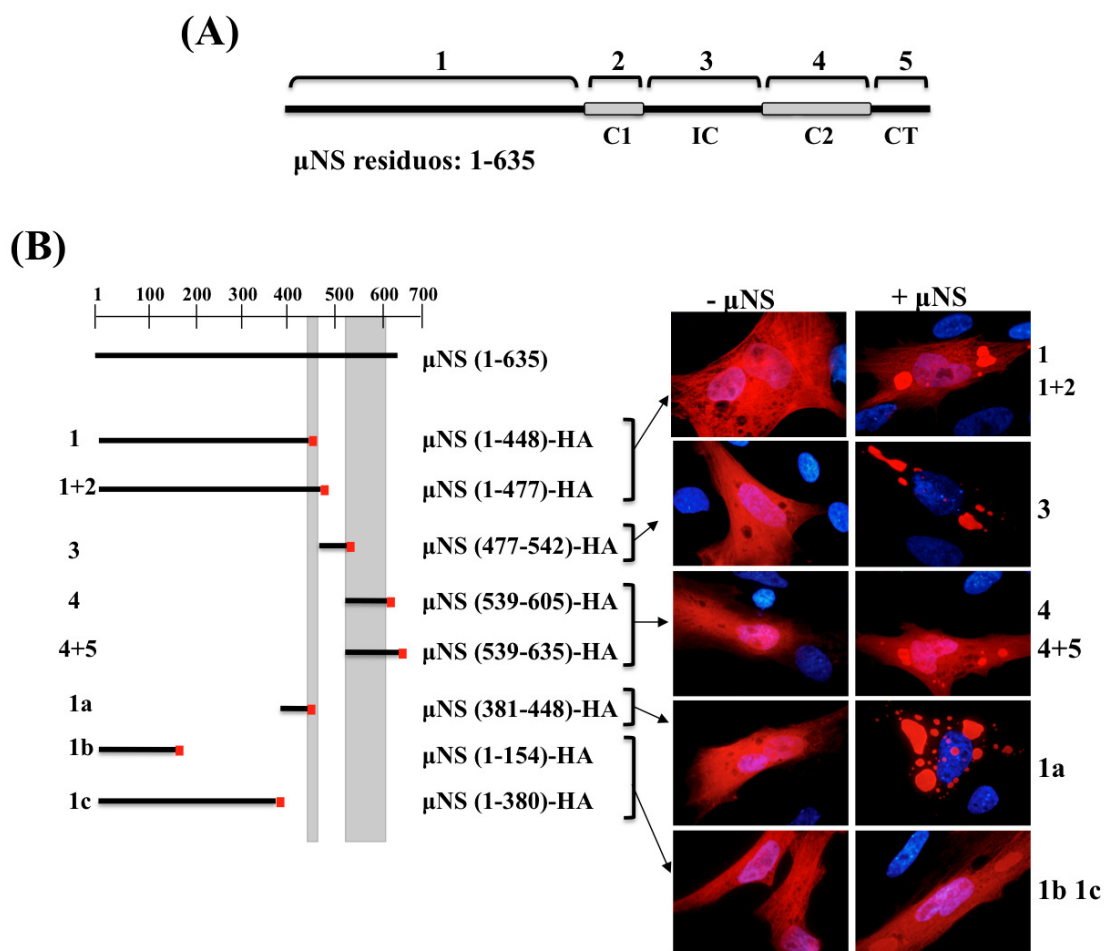


Figura 27. Delecciones de la proteína μNS y su incorporación a los cuerpos de inclusión formados por la proteína entera. A- Esquema de la proteína μNS donde se muestran las 5 regiones en que se ha dividido para su estudio. B- La proteína μNS, así como sus mutantes fusionados con HA están representados siguiendo las mismas reglas que para las Figuras 18 y 25. El epitopo HA se representa como una pequeña barra roja. En la parte derecha de la figura se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de los paneles (-μNS) o co-transfectadas con esos mismos plásmidos y pCINeo-μNS (+μNS). Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo policlonal contra el epitopo HA (rojo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

Para visualizar μNS y sus regiones de forma independiente en la misma célula, las regiones de μNS se expresaron fusionadas al extremo amino del epitopo HA del virus influenza, con lo que se podían detectar mediante inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales contra el epitopo HA. El análisis por Western-blot, usando anticuerpos policlonales contra μNS, reveló que la mayoría de las proteínas se expresan bien y con el tamaño esperado (datos no mostrados). Por motivos que desconocemos fuimos incapaces de detectar la expresión de los dominios Coil1 (región 2) y C-Tail (región 5), sin fusionar o fusionados a HA en sus extremos amino y carboxilo. Para analizar indirectamente la interacción de estos dos dominios con las inclusiones de μNS, lo que hicimos fue fusionar estos dominios a otros que sí se podían detectar, con el

objeto de comparar si su presencia/ausencia influye en el comportamiento de los mutantes detectables. Así, creamos los mutantes μ NS(1-477)-HA (región 1+2), donde le añadimos el Coil1 a la región N-terminal, y el μ NS(539-635)-HA (región 4+5), donde añadimos el C-Tail al Coil2.

El análisis por inmunofluorescencia reveló que, cuando se expresan solos, todos los mutantes de μ NS se distribuyen de forma difusa por todo el citoplasma y núcleo (Figura 27B, fotografías de la izquierda). Además, la fusión de HA al extremo carboxilo no parece influir en la distribución intracelular de los mutantes, que previamente fueron expresados sin tag (Figuras 18 y 19), ya que coincide exactamente con la distribución de los mutantes sin fusionar

Cuando se realizó un análisis similar en células que co-expresan estas construcciones y μ NS se obtuvieron los siguientes resultados:

i) El dominio Intercoil que comprende los residuos 477-542 es el que se incorpora más eficientemente a las inclusiones de μ NS, ya que toda la proteína se detecta en los cuerpos de inclusión (Figura 27B, fotografías de la derecha, panel 3).

ii) El dominio N-terminal (μ NS(1-448)) se incorpora a las inclusiones, aunque se detecta algo de proteína por el núcleo y citoplasma (Figura 27B, fotografías de la derecha, panel 1 y 1+2). El mismo patrón de distribución presentaba la región 1-477, que incluye toda la región N-terminal y el Coil1 (Figura 27B, fotografías de la derecha, panel 1 y 1+2). De ello deducimos: i) que en esta región (μ NS(1-448)) existe algún dominio de interacción que provoca su incorporación a las inclusiones; y ii) que el primer dominio “coiled-coil” no parece ser determinante en la incorporación a las inclusiones. Consecuentemente decidimos subdividir esta región en fragmentos para tratar de localizar el dominio de interacción. Así, creamos los mutantes: μ NS(381-448)HA, μ NS(1-154)HA y μ NS(1-380)HA (Figura 27B, regiones 1a, 1b y 1c).

Las regiones μ NS(1-380) y μ NS(1-154) se incorporan a las inclusiones pero pobremente, ya que se detecta mucha proteína por todo el núcleo y citoplasma (Figura 27, fotografías de la derecha, panel 1b 1c). Sin embargo, la región μ NS(381-448) se incorpora eficientemente a las inclusiones, ya que toda la proteína se detectó en los cuerpos de inclusión (Figura 27B, fotografías de la derecha, panel 1a).

iii) El Coil2, residuos 539 a 605, también se incorpora a las inclusiones, aunque no de forma tan eficiente como las regiones anteriores, ya que se detecta proteína tanto en la inclusión como por toda la célula y núcleo (Figura 27B, fotografías de la derecha, panel 4 y 4+5). La fusión del C-Tail al Coil2, para formar el mutante μ NS(539-635)-HA, no parece influir en la incorporación a las inclusiones (Figura 27, fotografías de la derecha, 4 y 4+5). Este es un resultado sorprendente, ya que en las secciones anteriores encontramos evidencias de que este dominio C-Tail juega un papel clave en la orientación de los contactos entre los monómeros de μ NS para formar oligómeros basales, controlando así la forma de las inclusiones y la eficiencia de su formación. Sin embargo, con la metodología empleada en este apartado, no hemos sido capaces de detectar su participación en la interacción directa entre monómeros.

Basándonos en estos resultados, podemos concluir que las regiones que poseen un mayor grado de interacción específica con la proteína completa son los dominios Intercoil [μ NS(477-542)] y μ NS(381-448). Por otra parte, los dominios que demuestran un menor grado de interacción específica son Coil2, C-Tail, y la región N-terminal de μ NS 1-380. Otra región con bajo grado de interacción según estos resultados, es el primer “coiled-coil” o Coil1 (residuos 448-477), ya que su delección no parece influir en la incorporación a las inclusiones; μ NS(1-477) se incorpora tan eficientemente como μ NS(1-448) (ver Figura 27B, fotografías de la derecha, panel 1 y 1+2).

4.1. Identificación de regiones de μ NS que arrastran eficientemente a la proteína GFP hacia las inclusiones de μ NS

A continuación decidimos comprobar si alguno de los dominios de μ NS es capaz de arrastrar a una proteína exógena a las inclusiones de μ NS sin afectar a la integridad de las mismas. Para ello, fusionamos la proteína GFP al extremo amino-terminal de los 5 diferentes dominios de μ NS mostrados en la Figura 27A. El uso de la proteína fluorescente facilita la detección de las quimeras e indica si la proteína asociada a las inclusiones está correctamente plegada. El análisis por Western-blot con anticuerpos policlonales contra μ NS, reveló que las proteínas expresadas tenían el tamaño esperado para cada construcción (datos no mostrados). En el caso de GFP fuimos capaces de crear y detectar quimeras con todos los dominios individuales de μ NS (Figura 28).

El análisis por microscopía de fluorescencia reveló que GFP y todas las proteínas de fusión se distribuyen de forma difusa por la célula en ausencia de inclusiones de μ NS (Figura 28, fotografías de la izquierda). A continuación se describen los resultados obtenidos al co-expresar las distintas construcciones con la proteína μ NS:

i) La proteína GFP sólo continuaba distribuyéndose de manera difusa por toda la célula, a pesar de que se detectó una pequeña parte en las inclusiones de μ NS (Figura 28, fotografías de la derecha, panel 1), lo que indica que GFP, aunque no queda excluida de las inclusiones, no se incorpora a ellas eficientemente. Obtuvimos resultados similares con las quimeras GFP- μ NS(1-154) y GFP- μ NS(1-380), GFP-Coil1 (μ NS(448-477)) y GFP-C-Tail (μ NS(605-635)) (Figura 28, fotografías de la derecha, paneles 2 y 7). Estos resultados se corresponden con los obtenidos en la sección anterior, en donde se demostró que estas regiones, μ NS(1-380), μ NS(1-154), μ NS(448-477), μ NS(605-635) no se incorporan de manera eficiente a las inclusiones.

ii) La quimera que contiene la región N-terminal, GFP- μ NS(1-448), se incorpora de forma eficiente a los cuerpos de inclusión, aunque se detecta algo de proteína por el núcleo y citoplasma (Figura 28, fotografías de la derecha, panel 3). Al añadirle el Coil1 a dicha quimera, generando la construcción GFP- μ NS(1-477) (Figura 28, fotografías de la derecha, panel 3) no cambia el patrón de distribución, coincidiendo con los resultados de la sección anterior. Del mismo modo, la quimera GFP- μ NS(1-380) no se incorpora a las inclusiones (Figura 28, fotografías de la derecha, panel 2), sin embargo, la región μ NS(381-448) fusionada con GFP no se recluta tan eficientemente a las inclusiones como sería de esperar, a la vista de los resultados de la sección anterior, ya que se detecta proteína tanto en la inclusión como por toda la célula (Figura 28, fotografías de la derecha, panel 4). Esto podría deberse a que la GFP bloquea/oculta la zona de interacción del fragmento con μ NS. Para intentar solucionarlo, fusionamos GFP a su extremo C-terminal y esta nueva quimera tampoco se incorporaba eficientemente a las inclusiones (Figura 28, fotografías de la derecha, panel 4). Parece que la presencia de la proteína GFP, independientemente de su posición (C-terminal o N-terminal) perturba la interacción entre este dominio y las inclusiones, mientras que no lo hace cuando se fusiona a la región N-terminal entera de μ NS (1-448).

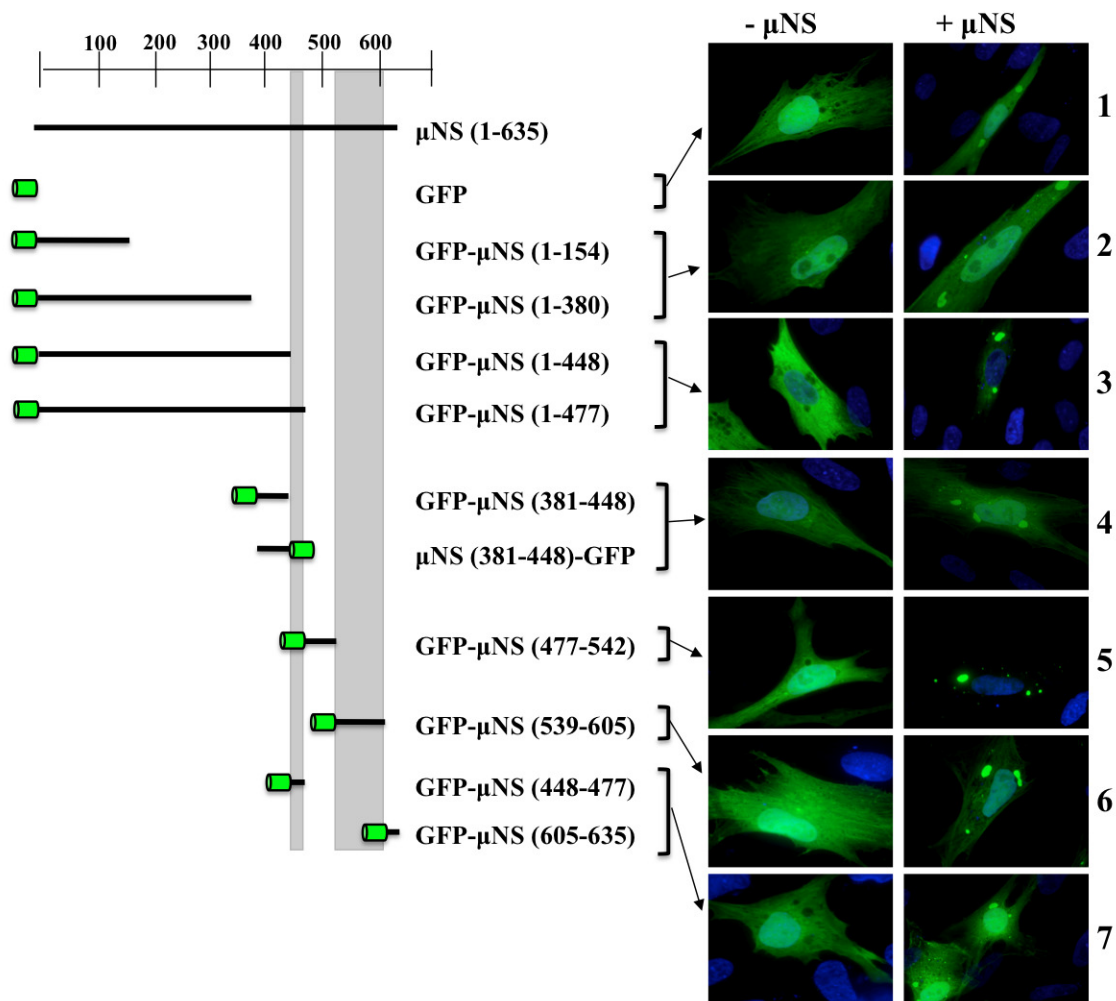


Figura 28. Fusiones de GFP a diferentes dominios de la proteína μ NS y su incorporación a las inclusiones que forma la proteína μ NS entera. La proteína μ NS, así como sus quimeras, están representadas siguiendo las mismas reglas que para la figura 27. La proteína GFP está representada como un barril de color verde. A la derecha se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de los paneles (- μ NS) o co-transfectadas con esos mismos plásmidos y pCINEO- μ NS (+ μ NS). Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

El dominio Intercoil fusionado a GFP se incorpora muy eficientemente a las inclusiones formadas por μ NS, ya que toda la proteína GFP se detectó en los cuerpos de inclusión (Figura 28, panel 5).

El dominio Coil2, μ NS(539-605) fusionado con GFP es reclutado a las inclusiones, aunque no de forma tan eficiente como el Intercoil, ya que se detecta proteína tanto en la inclusión como en el resto de la célula (Figura 28, panel 6).

Los resultados aquí expuestos demuestran que el etiquetado de proteínas con determinados dominios de la proteína μ NS constituye un método novedoso para dirigir proteínas exógenas a las inclusiones citoplasmáticas generadas por μ NS, sin causar el desmantelamiento de las inclusiones. Teniendo en cuenta nuestros resultados, el dominio Intercoil [μ NS(477-542)] parece el más adecuado para realizar dicho etiquetado, ya que es suficientemente pequeño para no alterar la naturaleza de la proteína problema y es el que se incorpora más eficientemente a las inclusiones de μ NS (Figura 27 y Figura 28, paneles de la derecha, 3 y 5) tanto cuando está fusionado al epitopo HA, como a la proteína verde fluorescente. Es de destacar que, además de no afectar a la integridad de las inclusiones de μ NS, la proteína GFP reclutada está perfectamente plegada y es funcional, ya que sigue emitiendo su fluorescencia característica. A pesar de su inferior eficiencia, los dominios Coil2 y μ NS(381-448) también podrían utilizarse para el mismo fin.

4.2. Identificación de regiones de μ NS sin fusionar o fusionadas a GFP que son reclutadas específica y eficientemente a las inclusiones que forma μ NS-Mi

A continuación realizamos un estudio similar al de las anteriores secciones para averiguar si los dominios que interaccionan con μ NS también interaccionan con μ NS-Mi, la región mínima de μ NS capaz de generar inclusiones citoplasmáticas cuando se expresa sin fusionar. Los resultados fueron idénticos a los obtenidos en células que co-expresaban μ NS entera, pero con dos diferencias. La primera diferencia es que las construcciones que contienen la región N-terminal de μ NS (1-448) no se incorporan a las inclusiones de μ NS-Mi, distribuyéndose de forma difusa por toda la célula (Figura 29, fotografías de la derecha, paneles 1 y 2). Deducimos por tanto, que la región aminoterminal de μ NS (1-448) no interacciona con μ NS-Mi y que su capacidad para interaccionar con μ NS está probablemente supeditada a que esta región esté presente en la proteína entera. La segunda diferencia es que la región que incluye todo el extremo amino y el primer “coiled-coil” (residuos 1-477) sí se incorpora a las inclusiones aunque de forma poco eficiente (Figura 29, fotografías de la derecha, panel 3), lo que constituye la primera evidencia obtenida con esta metodología de que este dominio está implicado también en las interacciones entre monómeros de μ NS.

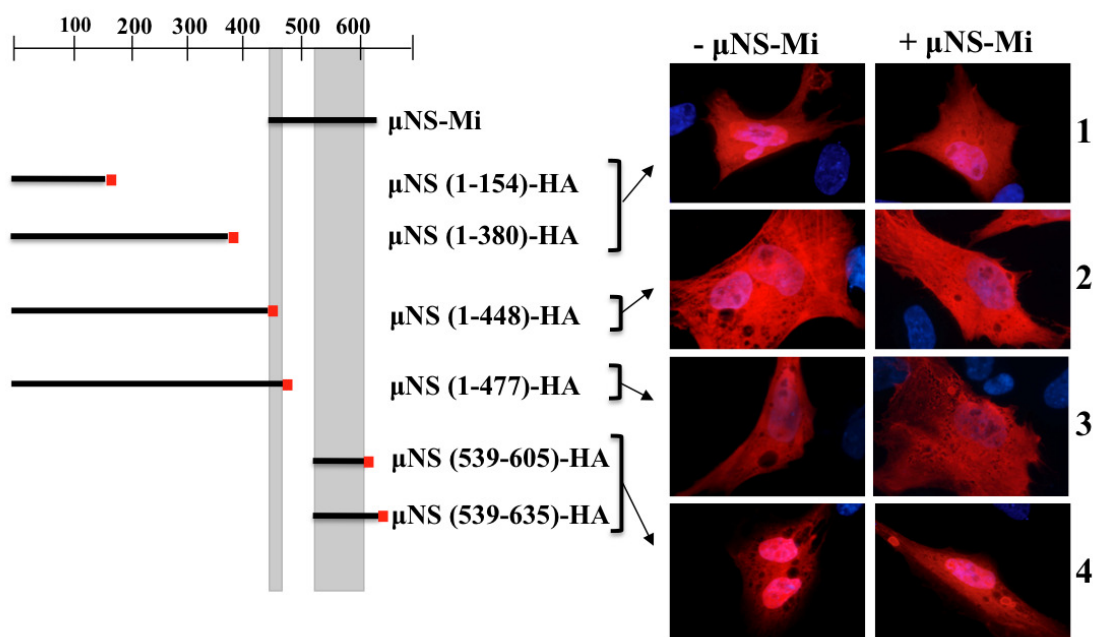


Figura 29. Delecciones de la proteína μ NS y su incorporación a cuerpos de inclusión formados por la proteína μ NS-Mi. La proteína μ NS-Mi así como las regiones de μ NS están representadas siguiendo las mismas reglas que para la figura 27. A la derecha se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de los paneles (- μ NS-Mi) o co-transfectadas con esos mismos plásmidos y pCINeo- μ NS-Mi (+ μ NS-Mi). Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra el epítipo HA (rojo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

El dominio Intercoil (región 477-542) fusionado con HA no pudo ser detectado cuando se co-expresó con μ NS-Mi, pero sí cuando se expresaba en ausencia de μ NS-Mi, lo que sugiere que el epítipo HA probablemente quede oculto dentro de las inclusiones y fuera del alcance del anticuerpo.

El dominio Coil2 (región 539-605) se incorpora a las inclusiones, aunque de forma poco eficiente, ya que se detecta proteína tanto en la inclusión como por toda la célula (Figura 29, fotografías de la derecha, panel 4). Al añadirle el C-Tail al Coil2 no observamos ninguna mejora (Figura 29, fotografías de la derecha, panel 4) coincidiendo con los resultados obtenidos en las secciones anteriores.

A continuación decidimos comprobar si estos dominios también son capaces de dirigir a la proteína GFP a las inclusiones de μ NS-Mi, cuando están fusionados al

extremo carboxilo de la proteína fluorescente. Lo primero que hicimos fue co-expresar μ NS-Mi con GFP y comprobar que la proteína GFP continuaba distribuyéndose de manera difusa por la célula, a pesar de que una pequeña parte se detectó en las inclusiones (Figura 30, fotografías de la derecha, panel 1), lo que indica que GFP por sí sola no se incorpora a las inclusiones.

Obtuvimos resultados similares al co-expresar la fusión GFP-C-Tail con μ NS-Mi (Figura 30, paneles de la derecha, comparar paneles 1 y 6), lo que se corresponde con los resultados obtenidos en la sección anterior.

GFP-Coil1 (región 448-477), se recluta a los cuerpos de inclusión más eficientemente que GFP sola, aunque una parte de la proteína se distribuía por toda la célula (Figura 30, paneles de la derecha, comparar paneles 1 y 5). Lo mismo sucede con la quimera GFP- μ NS(1-477), que contiene el Coil1 y la región N-terminal de μ NS que no interacciona con μ NS-Mi (Figura 30, paneles de la derecha, comparar paneles 1 y 2). Hay que destacar que la quimera GFP- μ NS(1-477) se recluta ligeramente mejor que GFP-Coil1 (Figura 30, paneles de la derecha, comparar paneles 2 y 5), probablemente debido a que la proximidad de GFP al Coil1 provoca un impedimento estérico que dificulta a su incorporación a las inclusiones, mientras que en el caso de GFP- μ NS(1-477) el dominio de Coil1 está más alejado de GFP y no se vería afectado. Al igual que en la sección anterior, estos resultados demuestran que el dominio Coil1 es reclutado a las inclusiones, aunque de forma poco eficiente.

De nuevo, la región Intercoil (residuos 477-542) fusionada a GFP se incorpora muy eficientemente a los cuerpos de inclusión formados por μ NS-Mi, ya que toda la fluorescencia se detectó en las inclusiones (Figura 30, panel 3).

También el Coil2 recluta a GFP a las inclusiones, pero no tan eficientemente como el Intercoil, ya que se detecta proteína tanto en la inclusión como por toda la célula (Figura 30, panel 4).

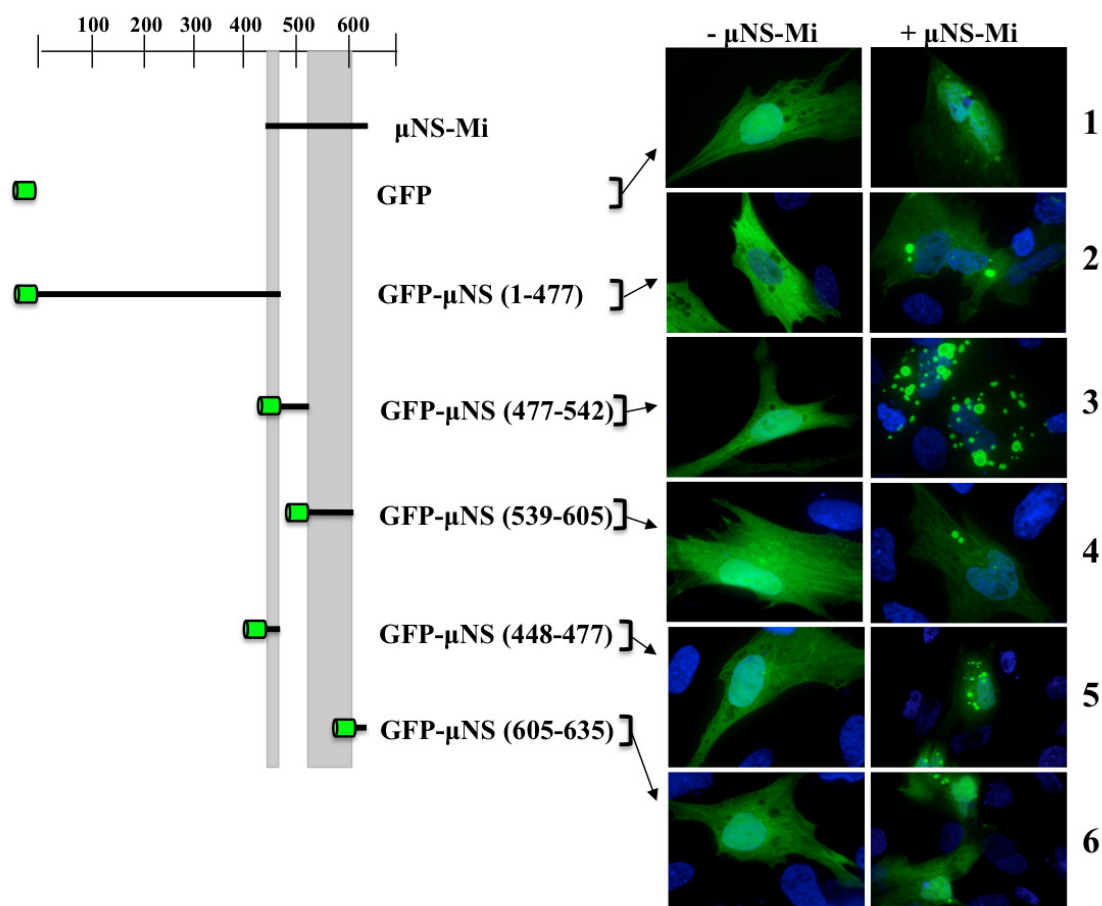


Figura 30. Fusiones de GFP a diferentes dominios de la proteína μ NS y su incorporación a las inclusiones que forma la proteína μ NS-Mi. La proteína μ NS-Mi así como sus quimeras están representadas siguiendo las mismas reglas que para la figura 27. La proteína GFP está representada como un barril de color verde. A la derecha se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células CEF transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de los paneles (- μ NS-Mi) o co-transfectadas con esos mismos plásmidos y pCINeo- μ NS-Mi (+ μ NS-Mi). Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se visualizaron con un microscopio de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

Los resultados de esta sección demuestran que distintos dominios de la proteína μ NS se pueden utilizar como etiquetas moleculares para dirigir proteínas a las inclusiones formadas por μ NS-Mi. Al igual que en la sección anterior, el dominio Intercoil parece ser el más adecuado y la proteína GFP reclutada mantiene su estructura y actividad. Asimismo, podemos inferir de los resultados mostrados en esta sección que los dominios de μ NS que se sitúan hacia el extremo N-terminal de la proteína, en concreto el situado entre los residuos 381-448, no interactúan con μ NS-Mi, mientras que sí lo hacen y de manera muy eficiente con la proteína entera.

5. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA PURIFICAR PROTEÍNAS EXPRESADAS EN CÉLULAS DE INSECTO BASADO EN SU RECLUTAMIENTO A LAS INCLUSIONES QUE FORMAN LAS PROTEÍNAS μ NS Y μ NS-Mi

Teniendo en cuenta que las inclusiones citoplasmáticas formadas por las proteínas μ NS y μ NS-Mi son capaces de secuestrar a proteínas activas cuando están etiquetadas con el dominio Intercoil, y que las inclusiones que forman estas proteínas en células de insecto se pueden purificar fácilmente preservando su estructura, decidimos explorar la posibilidad de utilizar este sistema como un método simple y barato para purificar proteínas. La generación de los baculovirus recombinantes que expresan las proteínas μ NS y μ NS-Mi y la caracterización de su expresión en células de insecto ya han sido descritas previamente (Figura 17B y Figura 21B) y se muestran en la figura 31A y 31B (carriles 3 y 4).

Para poder utilizar nuestro método para la purificación de proteínas se construyeron dos baculovirus nuevos: uno que expresa GFP (Bac-GFP) y otro que expresa GFP fusionada al dominio Intercoil (Bac-GFP-Intercoil) con una secuencia diana para la proteasa factor Xa entre ambos dominios proteicos. El uso de la proteína verde fluorescente facilita el seguimiento del proceso de purificación y permite comprobar fácilmente el correcto plegamiento y funcionalidad de la proteína a purificar. Como en el caso de μ NS y μ NS-Mi, la expresión de la proteína GFP recombinante y de GFP-Intercoil (GFP*IC) en células de insecto se analizó mediante electroforesis y Western-blot a las 72 h.p.i. Como se muestra en la Figura 31A, se detectó la expresión de proteínas de 30 y 38 kDa en los extractos de células de insecto infectadas con los correspondientes baculovirus recombinantes (carriles 5 y 6), pero no en los extractos de células sin infectar (carril 1) o infectadas con el baculovirus salvaje (carril 2). Además, estas proteínas fueron reconocidas por el anticuerpo monoclonal contra GFP (Figura 31C, carriles 5 y 6). Tanto GFP como GFP-Intercoil (GFP*IC) mostraban una distribución difusa por toda la célula (Figura 31D, paneles de abajo).

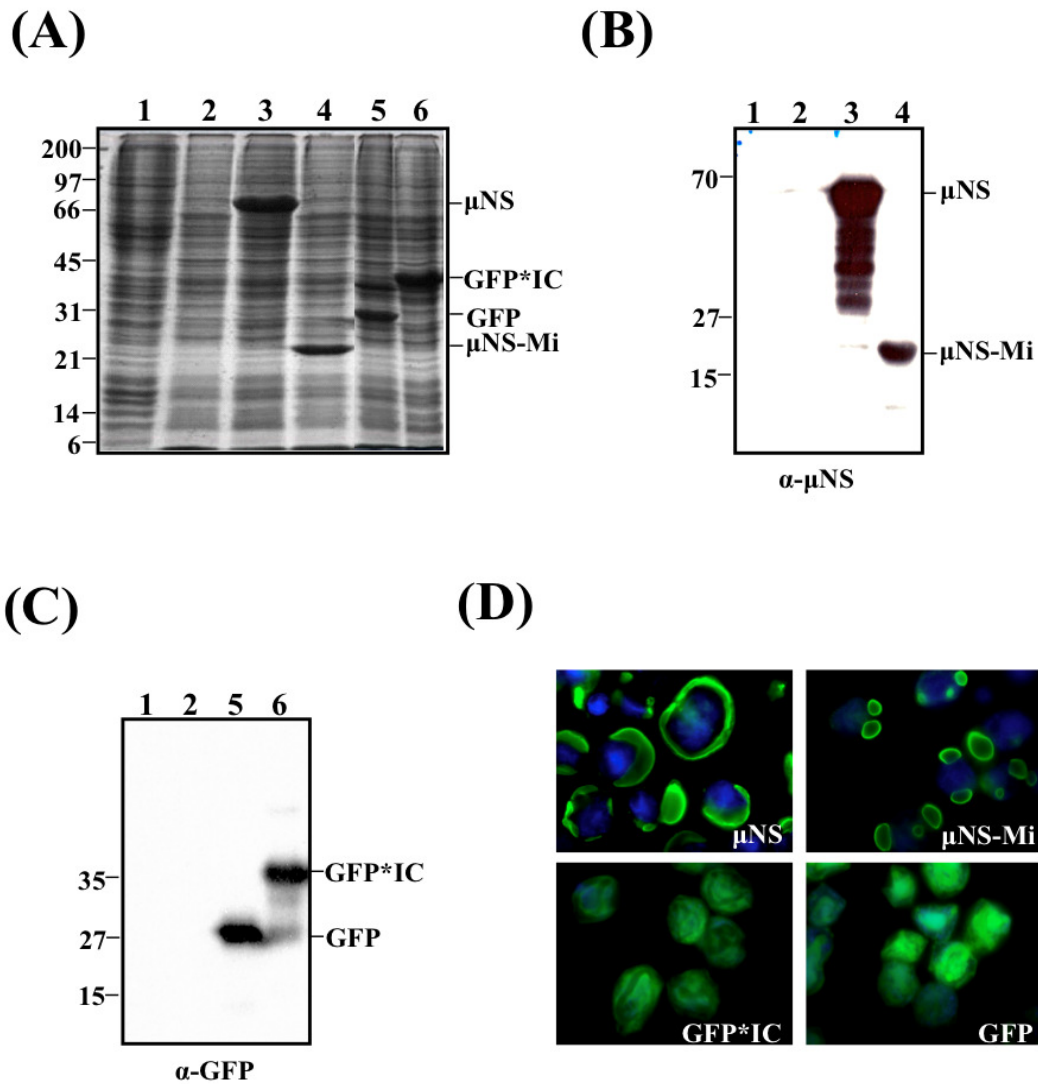


Figura 31. Análisis de la expresión de los baculovirus de μ NS, μ NS-Mi, GFP y GFP-Intercoil en células de insecto. A- Gel del 12,5 % teñido con azul de Coomassie donde se resolvieron muestras correspondientes a células Sf9 sin infectar (canal 1) o infectadas con los siguientes baculovirus recombinantes: Bac-Wt (canal 2), Bac- μ NS (canal 3), Bac- μ NS-Mi (canal 4), Bac-GFP (canal 5) y Bac-GFP-Intercoil (GFP*IC, canal 6). Las muestras se lisaron en tampón Laemmli a las 72 h.p.i. antes de someterlas a electroforesis. B- Análisis mediante Western-blot de lisados de células Sf9 sin infectar (canal 1), o infectadas con Bac-Wt (canal 2), Bac- μ NS (canal 3) o Bac- μ NS-Mi (canal 4) usando anticuerpos policlonales contra μ NS. C- Análisis mediante Western-blot de lisados de células Sf9 sin infectar (canal 1), infectadas con Bac-Wt (canal 2), Bac-GFP (canal 5) o Bac-GFP-Intercoil (GFP *IC, canal 6) usando un anticuerpo monoclonal contra GFP. D- Imágenes de microscopía de fluorescencia de células Sf9 que habían sido infectadas con los siguientes baculovirus: Bac- μ NS, Bac- μ NS-Mi, Bac-GFP y Bac-GFP-Intercoil (GFP*IC). Las células se fijaron a las 72 h.p.i. y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra μ NS (verde) (paneles de arriba) o se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia, en el caso de las que expresaban GFP (verde) (paneles de abajo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

5.1. Protocolo de purificación utilizando inclusiones de μ NS

Para comprobar la eficacia del sistema para la purificación co-infectamos células de insecto Sf9 con los baculovirus recombinantes que expresan las proteínas: μ NS y GFP-Intercoil (GFP*IC) (Figura 32B). Como control negativo se co-infectaron las células con los baculovirus que expresan las proteínas μ NS y GFP sin etiquetar (Figura 32A). Los primeros pasos de la purificación se realizaron del mismo modo que para purificar las inclusiones de μ NS (ver pie de Figura 32A y métodos). El contenido proteico de los extractos purificados se muestra en el carril 5 de las figuras 32A y 32B. En todos los casos, la identidad de las proteínas expresadas se confirmó mediante Western-blot utilizando anticuerpos contra μ NS (Figuras 32A y 32B, paneles intermedios) y contra GFP (Figuras 32A y 32B, paneles inferiores). En el control negativo (Figura 32A) se observó que la mayoría de la proteína GFP sin etiquetar se libera al sobrenadante tras la lisis celular (canal 2). Las trazas de GFP que todavía quedan en el pellet se eliminan completamente en los lavados realizados durante el proceso de purificación, lo que queda patente al observar el Western-blot realizado con anticuerpos contra GFP (Figura 32A, panel inferior, comparar canales 2, 3, 4 y 5). Por el contrario, la proteína GFP etiquetada con el dominio Intercoil (Figura 32B, GFP*IC) queda firmemente asociada a las inclusiones de μ NS, ya que la mayor parte está presente en el pellet final purificado (Figura 32B, canal 5). Estos resultados se confirmaron mediante análisis de las células por microscopía de fluorescencia (Figura 32D). Así, se observa que la proteína GFP etiquetada (panel de la derecha) se asocia fuertemente con las inclusiones formadas por la proteína μ NS, mientras que esto no sucede con la no etiquetada (panel de la izquierda).

Al comparar los carriles 3 y 5 de la figura 32B se observa una diferencia muy considerable de cantidad de las proteínas μ NS y GFP-Intercoil. Esto es debido a que, en ausencia de sal, las inclusiones tienden a agregarse y se vuelven insolubles, lo que hace muy difícil cargarlas en el gel (carril 3), mientras que las inclusiones purificadas finales se resuspenden en 500 mM de NaCl antes de cargarlas en el gel (canal 5) y este tratamiento disgrega los complejos y facilita su manipulación.

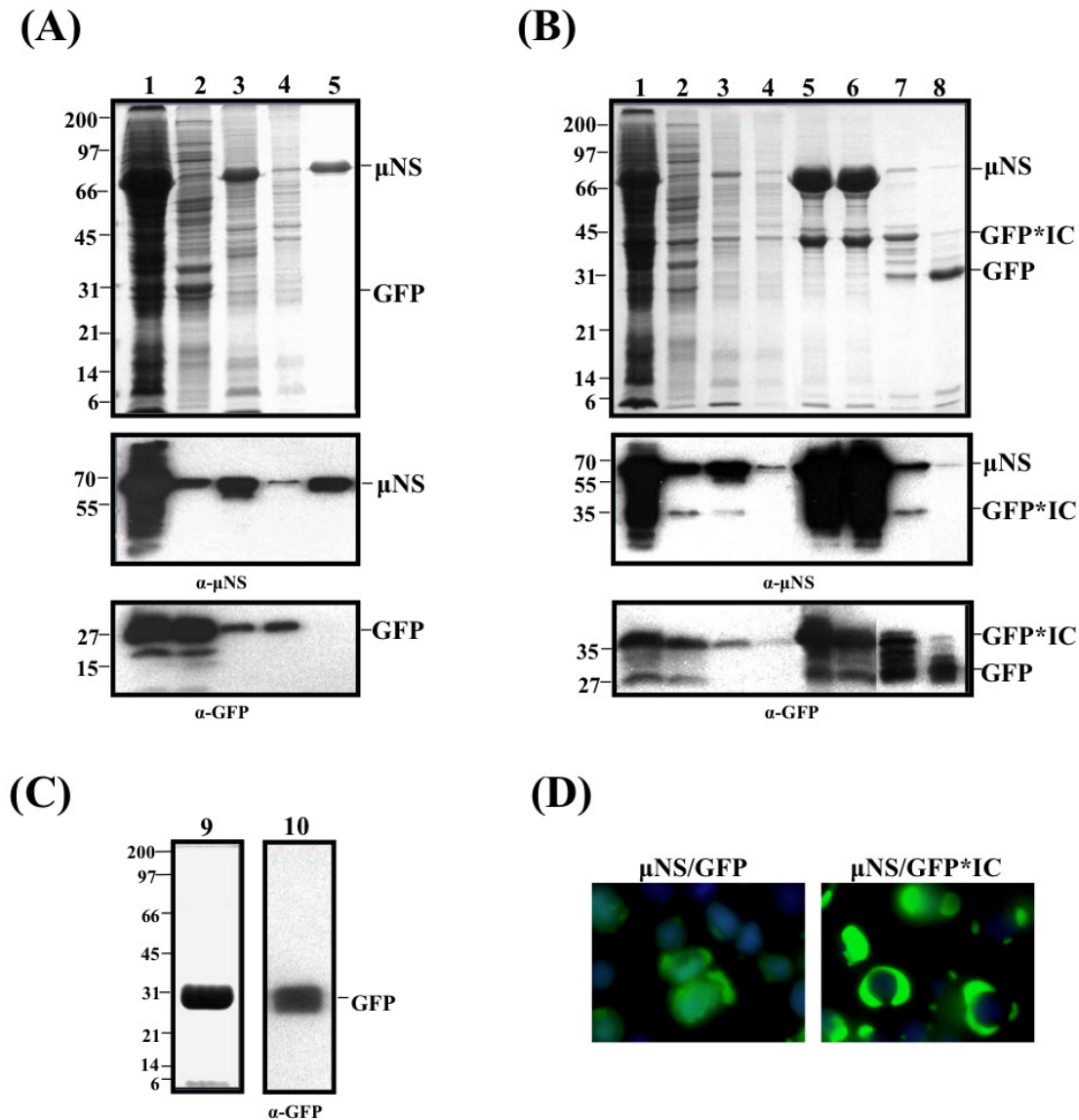


Figura 32. Expresión y purificación de GFP-Intercoil integrada en las inclusiones formadas por μ NS. A- Expresión, purificación y análisis mediante Western-blot de inclusiones de μ NS co-expresadas con GFP. Células Sf9 co-infectadas con Bac- μ NS y Bac-GFP se lisaron en tampón hipotónico a las 72 h.p.i., y el extracto celular resultante (línea 1) se fraccionó por centrifugación en pellet y sobrenadante (en la línea 2 se muestra el sobrenadante). El pellet se lavó dos veces en tampón hipotónico, se resuspendió en el mismo volumen de tampón hipotónico y se sonicó. El extracto sonicado (línea 3) se centrifugó, y fraccionó en pellet y sobrenadante (en la línea 4 se muestra el sobrenadante). El pellet se lavó y centrifugó cinco veces (línea 5). Todas las muestras se resolvieron en un gel del 12,5 % de SDS-poliacrilamida y las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (panel superior). Muestras de cada uno de los pasos de purificación se analizaron mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra μ NS (panel del medio) o un anticuerpo monoclonal contra GFP (panel inferior). La posición de μ NS y GFP se indica a la derecha de los paneles y la de los marcadores de masas moleculares a la izquierda. B- Expresión, purificación y análisis mediante Western-blot de GFP-Intercoil co-expresada con μ NS. Los primeros pasos de la purificación se realizaron como se indica arriba. El pellet lavado y resuspendido en sal (línea 5) se centrifugó, y el sobrenadante (línea 6) se pasó a través de una columna de desalado. El eluido se centrifugó y el sobrenadante (línea 7) se incubó con el factor Xa (línea 8). Todas las muestras se resolvieron en un gel del 12,5 % de SDS-poliacrilamida y las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (panel de arriba). Muestras de cada uno de los pasos de purificación se analizaron mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra μ NS (panel del medio) o un anticuerpo monoclonal contra GFP (panel inferior). La posición de μ NS y GFP-Intercoil (GFP *IC) se indica a la derecha de los paneles y la de los marcadores de masas moleculares a la izquierda. C- Purificación de GFP. El extracto incubado con factor Xa (Figura 32B, canal 8) se centrifugó y el sobrenadante se cargó en una columna de Q-sepharosa. La proteína eluida se concentró y analizó

mediante SDS-PAGE (línea 9) y Western-blot usando anticuerpo monoclonal contra GFP (línea 10). D-Imágenes de microscopía de fluorescencia de células Sf9 co-infectadas con Bac- μ NS/ Bac-GFP o con Bac- μ NS/Bac-GFP-Intercoil (GFP*IC). Las células se fijaron a las 72 h.p.i. y se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

Con objeto de purificar la proteína GFP-Intercoil, las inclusiones de μ NS del pellet final (5) se dismantelaron por incubación con 500 mM de NaCl. La muestra resuspendida en sal se centrifugó 5 minutos a 16.000 x g, para eliminar los restos insolubles, y el sobrenadante (Figura 32B, carril 6) se pasó a través de una columna de desalado para permitir la reasociación de los monómeros de μ NS y la consiguiente liberación de GFP-Intercoil. El eluido se centrifugó 5 minutos a 16.000 x g, para eliminar restos insolubles, quedándonos con el sobrenadante (Figura 32B, carril 7) que apenas contiene proteína μ NS (Figura 32B, comparar carril 6 con carril 7), y que contiene la proteína GFP-Intercoil y algunas bandas secundarias que se corresponden con fragmentos de degradación de GFP-Intercoil, ya que se detectaron con el anticuerpo monoclonal contra GFP (Figura 32B, carril 7, paneles de abajo). El extracto sin sal se incubó posteriormente con el Factor Xa para liberar GFP de su unión al Intercoil (Figura 32B, carril 8, panel de arriba), lo que se confirmó mediante análisis por Western-blot (Figura 32B, carril 8, panel de abajo). Asimismo, se observó que los restos de μ NS se van perdiendo, probablemente debido a su insolubilidad en ausencia de sal, lo que se comprobó mediante Western-blot (Figura 32B, carril 8, panel de arriba y del medio). Además, también se observa una banda en el gel de un tamaño aproximado de 7 kDa, que se corresponde con el tamaño del dominio Intercoil (Figura 32B, carril 8, panel de arriba). Para completar la purificación y eliminar los restos de μ NS, Intercoil y proteasa, el extracto mostrado en el canal 8 de la figura 32B se pasó por una columna de Q-Sepharosa preequilibrada con tampón hipotónico. La columna se eluyó con concentraciones crecientes de NaCl y las fracciones recogidas se analizaron por SDS-PAGE; GFP eluyó en la fracción de 400 mM de NaCl (datos no mostrados). Finalmente, las fracciones que contenían GFP se concentraron y la muestra de color verde se analizó por SDS-PAGE, observándose una única banda de unos 30 kDa (Figura 32C, panel 9), que mediante Western-blot se comprobó que se trataba de GFP (Figura 32C, panel 10).

5.2. Protocolo de purificación utilizando inclusiones de μ NS-Mi

Como habíamos demostrado anteriormente, el dominio Intercoil también dirige proteínas a las inclusiones formadas por μ NS-Mi. Por ello, decidimos probar también el sistema de purificación de proteínas con estas inclusiones, las cuales son más pequeñas y compactas que las que forma la proteína μ NS entera. Así, podríamos disponer de un sistema alternativo para acomodar a hipotéticas proteínas que no se pudieran purificar con las inclusiones de μ NS, o cuyo tamaño sea parecido al de μ NS. Para probar este sistema de purificación, seguimos el mismo procedimiento que con la proteína entera, y los resultados se muestran en la figura 33, cuya distribución es exactamente igual a la figura 32 con el objeto de facilitar su inspección. Aquí también utilizamos la proteína GFP sin etiquetar como control negativo (Figura 33A) y purificamos la quimera GFP-Intercoil (Figura 33B). Los resultados obtenidos fueron idénticos a los ya descritos cuando se co-expresaba la μ NS entera. Así, la proteína GFP sin etiquetar no se asocia con las inclusiones, mientras que la etiquetada con Intercoil se purifica fácilmente. Del mismo modo, las inclusiones purificadas se desmantelan con sal y la proteína etiquetada se recupera fácilmente en condiciones nativas. Estos resultados demuestran que esta metodología, basada en las inclusiones de μ NS, puede servir como una plataforma novedosa, simple y barata para la purificación de proteínas.

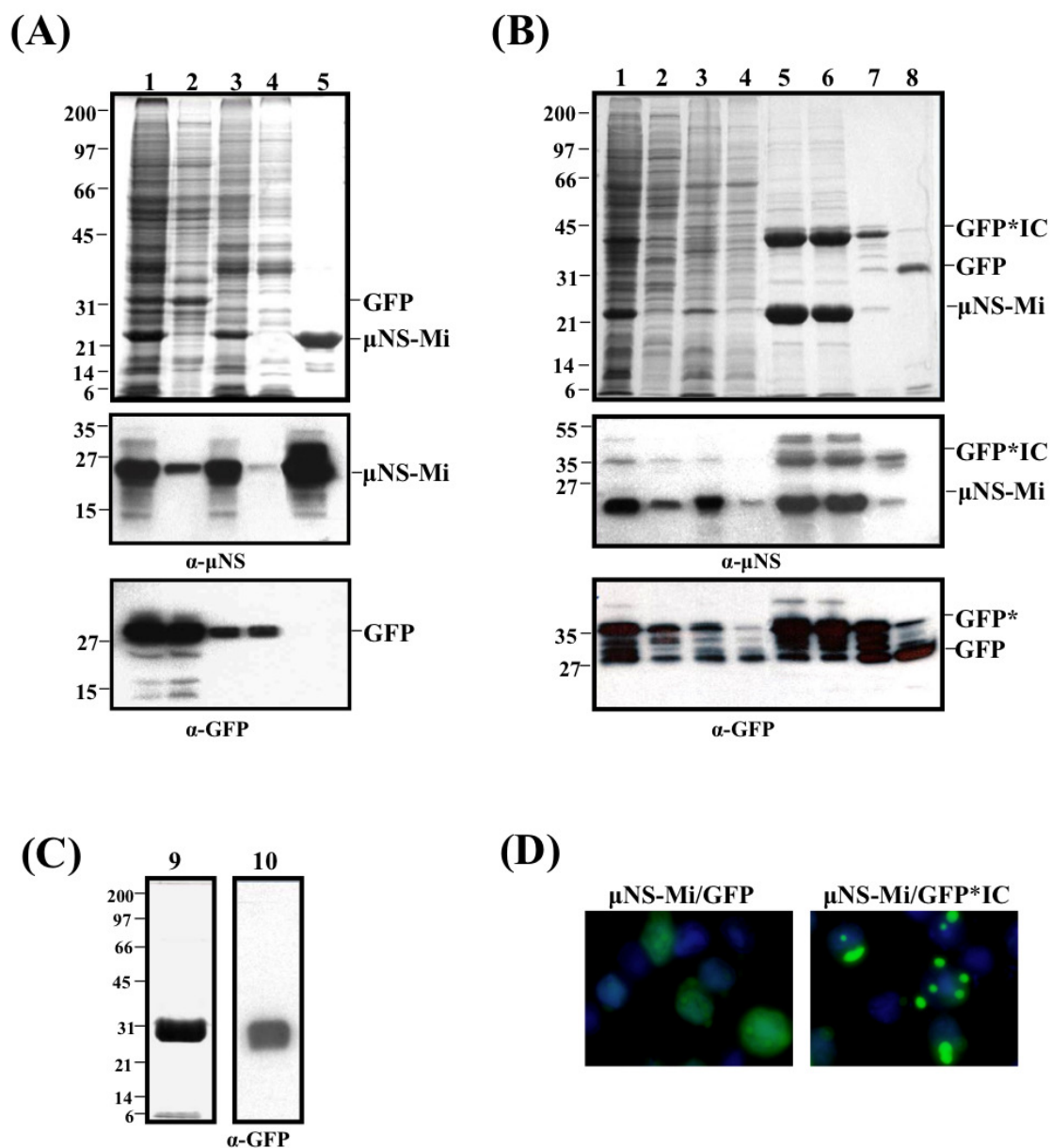


Figura 33. Expresión y purificación de GFP-Intercoil integrada en las inclusiones formadas por μ NS-Mi. La distribución de la figura y de sus muestras es exactamente igual a la descrita para la figura 32. La única diferencia radica en el uso de μ NS-Mi en lugar de μ NS.

5.3. Purificación de las inclusiones de GFP- μ NS y GFP- μ NS-Mi

Con objeto de facilitar el proceso de purificación de proteínas decidimos generar dos baculovirus nuevos que expresan μ NS y μ NS-Mi fusionados a la proteína GFP (Bac-GFP- μ NS y Bac-GFP- μ NS-Mi). Las inclusiones generadas por estas quimeras podrían ser visualizadas a simple vista, y de este modo facilitar su seguimiento durante la purificación. La expresión de la proteína GFP- μ NS y de GFP- μ NS-Mi recombinantes en células de insecto se analizó mediante electroforesis y Western-blot a las 72 h.p.i. Como se muestra en la figura 34, ambas quimeras se comportan de manera similar a las dos proteínas no quiméricas ya descritas, μ NS y μ NS-Mi. Tanto GFP- μ NS (Fig. 34A) como GFP- μ NS-Mi (Fig. 34C) se detectaron en los extractos de células de insecto infectadas con los correspondientes baculovirus recombinantes (carril 3), pero no en los extractos de células sin infectar (carril 1) o infectadas con el baculovirus salvaje (carril 2). Además, ambas proteínas fueron reconocidas por anticuerpos policlonales contra μ NS y por un anticuerpo monoclonal contra GFP (Figuras 34A y 34C líneas 7 y 8). El análisis de la distribución intracelular a las 72 h.p.i. de GFP- μ NS y GFP- μ NS-Mi en células de insecto, usando un microscopio de fluorescencia, puso de manifiesto que ambas proteínas formaban inclusiones fluorescentes (Figura 34B y 34D). Las inclusiones se purificaron siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para purificar μ NS y μ NS-Mi (Figura 17A). El pellet final de color verde se resuspendió en un pequeño volumen de tampón hipotónico. La tinción con azul de Coomassie del gel SDS-PAGE puso de manifiesto que las proteínas recombinantes GFP- μ NS y GFP- μ NS-Mi eran las proteínas más abundantes presentes en las inclusiones purificadas (Figuras 34A y 34C, línea 6). Además, las proteínas contaminantes, que en el gel aparecen como bandas débiles por debajo de GFP- μ NS y GFP- μ NS-Mi, fueron reconocidas por anticuerpos contra μ NS y contra GFP, sugiriendo que son productos procedentes de la degradación de ambas quimeras (Figuras 34A y 34C línea 7 y 8). Por tanto, concluimos que estas quimeras podrían utilizarse en el sistema de purificación como alternativa a μ NS y μ NS-Mi, teniendo la ventaja adicional de que se facilita el seguimiento del proceso de purificación gracias a que la proteína GFP colorea las inclusiones de verde.

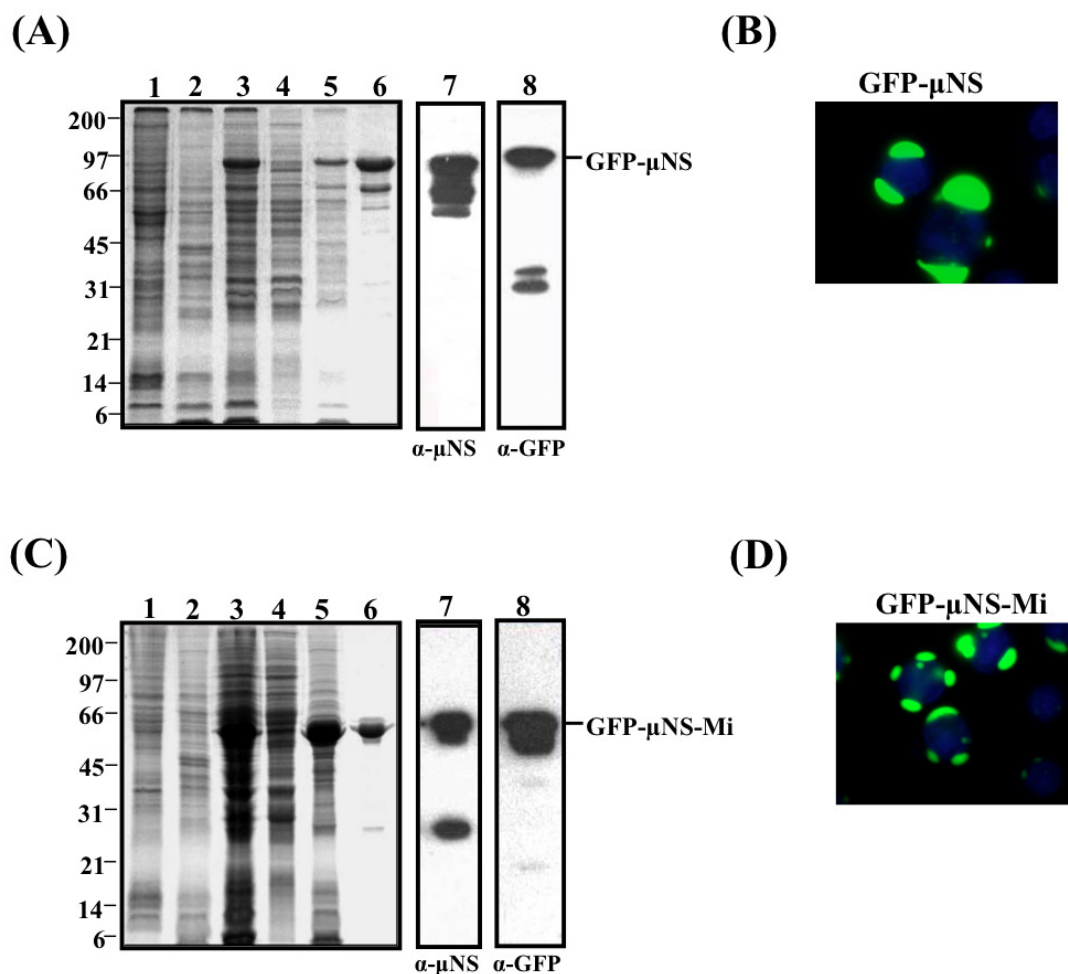


Figura 34. Expresión y purificación de las inclusiones formadas por GFP-μNS y GFP-μNS-Mi en células de insecto. A- Expresión, purificación y análisis mediante Western-blot de las inclusiones formadas por GFP-μNS. La expresión y purificación de las inclusiones de GFP-μNS se realizó tal y como se indica en la leyenda de la figura 17B. Todas las muestras se resolvieron en un gel del 10% de poliacrilamida y las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie. La posición de la proteína GFP-μNS recombinante se indica a la derecha y la de los marcadores de masa molecular a la izquierda. La muestra del carril 6 se analizó mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra μNS (carril 7) y un anticuerpo monoclonal contra GFP (carril 8). B- Análisis mediante microscopía de fluorescencia de la expresión de GFP-μNS. Células Sf9 se infectaron con el baculovirus que expresa la quimera GFP-μNS. Tres días después de la infección las células se fijaron y se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. C- Expresión, purificación y análisis mediante Western-blot de las inclusiones formadas por GFP-μNS-Mi. La expresión y purificación de las inclusiones globulares se realizó del mismo modo que en A. La posición de la proteína GFP-μNS-Mi recombinante se indica a la derecha y la de los marcadores de masa molecular a la izquierda. La muestra purificada del carril 6 se analizó mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra μNS (carril 7) y un anticuerpo monoclonal contra GFP (carril 8). D- Análisis mediante microscopía de fluorescencia de la expresión de GFP-μNS-Mi. Lo mismo que en B, pero en este caso las células se infectaron con el baculovirus que expresa la quimera GFP-μNS-Mi.

5.4. Purificación de Luciferasa activa

5.4.1. Expresión de luciferasa y luciferasa-Intercoil: la fusión del Intercoil no afecta a la actividad de la luciferasa

Decidimos comprobar si nuestro sistema de purificación podría ser utilizado para purificar enzimas activas y si éstas muestran actividad cuando están asociadas a las inclusiones de μ NS y derivados. Para comprobarlo se construyeron dos baculovirus nuevos: uno que expresa la enzima luciferasa de *Photinus pyralis* (Bac-Luc) y otro que expresa luciferasa fusionada al dominio Intercoil (Bac-Luc-IC). La expresión de la luciferasa recombinante (Luc) y de la luciferasa-Intercoil (Luc-IC) en células de insecto se analizó mediante electroforesis y Western-blot a las 72 h.p.i. Como se muestra en la figura 35A, una proteína de un tamaño de 60 kDa y otra de unos 68 kDa se detectaron en los extractos de células de insecto infectadas con los correspondientes baculovirus recombinantes (carriles 3 y 4), pero no en los extractos de células sin infectar (carril 1) o infectadas con el baculovirus salvaje (carril 2). Además, estas proteínas fueron reconocidas con anticuerpos policlonales contra luciferasa (Figura 35A, panel de abajo). Tanto la luciferasa como la luciferasa-Intercoil mostraban una distribución difusa por toda la célula (Figura 35B). Además, se comprobó que ambas proteínas recombinantes tenían actividad de luciferasa (Figura 35C, carriles 3 y 4). Debido a que la expresión de luciferasa es superior a la de la luciferasa fusionada al Intercoil, los datos que se muestran en la gráfica se obtuvieron tras normalizar los datos de la actividad con respecto a los de la cantidad de cada proteína, la cual se determinó mediante densitometría de las bandas que se muestran en el Western-blot contra la luciferasa, usando el programa “Quantity One” de Bio-Rad.

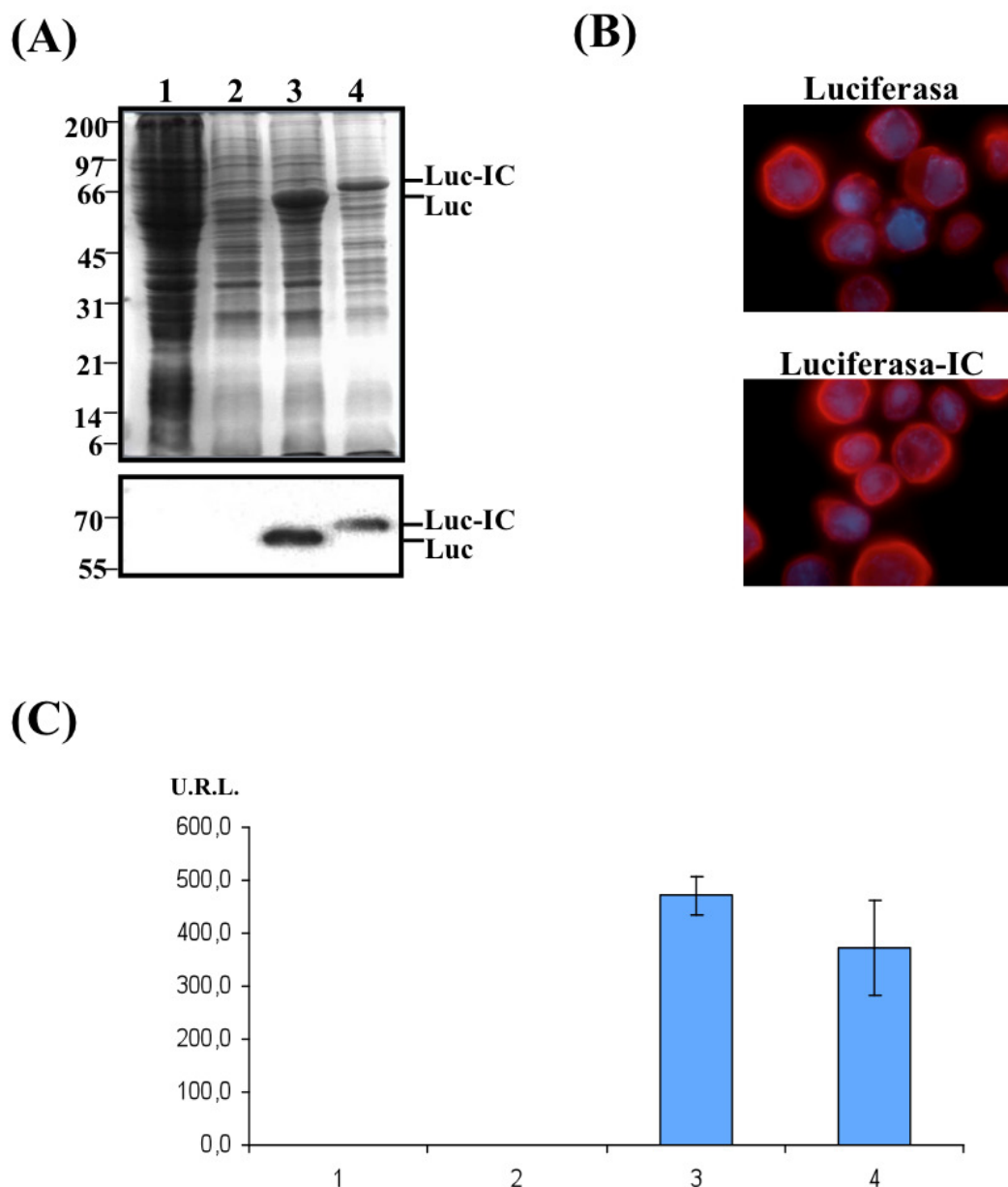


Figura 35. Análisis de la expresión de los baculovirus de la luciferasa y luciferasa-Intercoil en células de insecto Sf9. A- Análisis mediante SDS-PAGE y Western-blot de lisados de células Sf9 sin infectar (canal 1), o infectadas con Bac-Wt (canal 2), Bac-luciferasa (canal 3) y Bac-luciferasa-Intercoil (canal 4). Las muestras se lisaron en tampón Laemmli a las 72 h.p.i. antes de someterlas a electroforesis. La posición de las proteínas luciferasa (Luc) y luciferasa-Intercoil (Luc-IC) recombinantes se indican a la derecha y la de los marcadores de masa molecular a la izquierda. En el panel de abajo se muestra el Western-blot usando anticuerpos policlonales contra luciferasa de las diferentes muestras analizadas por SDS-PAGE. La posición de las proteínas luciferasa y luciferasa-Intercoil recombinantes se indican a la derecha y la de los marcadores de masa molecular a la izquierda. B- Imágenes de microscopía de fluorescencia de células Sf9 que habían sido infectadas con Bac-luciferasa y Bac-luciferasa-Intercoil. Las células se fijaron a las 72 h.p.i. y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra luciferasa (rojo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. C- Determinación de la actividad de la luciferasa. Las barras representan los niveles de luciferasa presentes en extractos de células Sf9 sin infectar (1) o infectadas con los siguientes baculovirus recombinantes: Bac-Wt (2) Bac-luciferasa (3) y Bac-luciferasa-Intercoil (4) a la 72 h.p.i. Las Unidades Relativas de Luz (U.R.L.) se indican a la izquierda del diagrama.

5.4.2. Purificación de la luciferasa-Intercoil activa

En primer lugar confirmamos mediante análisis de inmunofluorescencia que la luciferasa etiquetada con el Intercoil se incorpora a las inclusiones formadas por μ NS, μ NS-Mi y a sus versiones fusionadas con GFP. Así, en la figura 36 se observa que la luciferasa etiquetada (paneles de abajo) se asocia con las inclusiones formadas por la proteína GFP- μ NS-Mi, mientras que esto no sucede con la no etiquetada (paneles del medio). Resultados similares se obtuvieron cuando co-expresábamos luciferasa-Intercoil con μ NS, μ NS-Mi y GFP- μ NS (datos no mostrados).

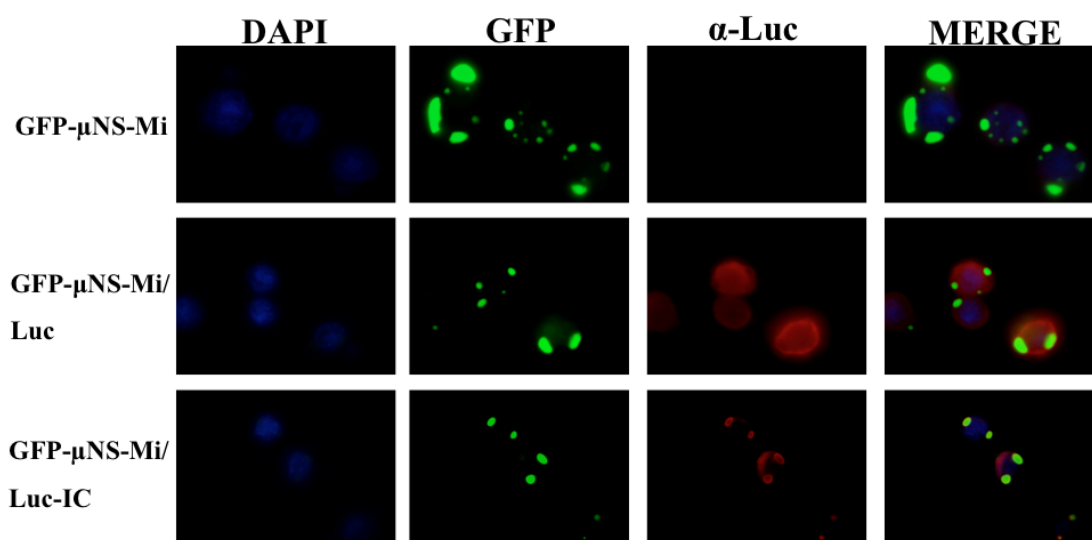


Figura 36. Distribución intracelular de luciferasa y de luciferasa-Intercoil en presencia de las inclusiones que forma GFP- μ NS-Mi. Células Sf9 semiconfluentes se infectaron con los baculovirus recombinantes que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 72 h.p.i. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra luciferasa (rojo). La GFP- μ NS-Mi se visualizó directamente (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

Para purificar la luciferasa-Intercoil, decidimos usar la construcción GFP- μ NS-Mi por dos razones: i) es la que produjo mejores resultados de purificación para esta proteína: de ahí la ventaja de contar con distintas opciones alternativas (μ NS, μ NS-Mi y sus fusiones con GFP), ya que se puede escoger la alternativa que de mejores resultados para la purificación de una proteína en particular; y ii) para demostrar que μ NS-Mi fusionada a GFP se puede utilizar como recambio de μ NS-Mi, lo que permitiría realizar un seguimiento visual del proceso de purificación. Lo primero que hicimos fue co-infectar células de insecto Sf9 con los baculovirus recombinantes que expresan las

proteínas: GFP- μ NS-Mi y luciferasa-Intercoil (Luc-IC), (Figura 37B). Como control negativo se co-infectaron las células con los baculovirus que expresan las proteínas GFP- μ NS-Mi y la luciferasa sin etiquetar (Luc) (Figura 37A). La purificación se hizo siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para purificar las inclusiones de μ NS tal y como se describe en métodos y en la leyenda de la figura 32A. La identidad de las proteínas expresadas se confirmó mediante Western-blot utilizando anticuerpos contra μ NS, GFP y luciferasa (Figuras 37A y 37B, paneles inferiores).

En el control negativo (Figura 37A) se observa como la mayoría de la luciferasa sin etiquetar (Luc) se libera al sobrenadante tras la lisis celular (canal 2). Las trazas de luciferasa que todavía quedan en el pellet se eliminan completamente en los lavados realizados en el proceso de purificación, lo que queda patente al observar el Western-blot realizado con anticuerpos contra luciferasa (Figura 37A, panel α -Luc, comparar canales 2, 3, 4 y 5). Por el contrario, la luciferasa etiquetada con el dominio Intercoil (Figura 37B) queda firmemente asociada a las inclusiones de GFP- μ NS-Mi, ya que la mayor parte se detecta en el pellet final purificado (Figura 37B, canal 5). Además, la luciferasa asociada a las inclusiones se elimina fácilmente de la solución,, bien por centrifugación (Figura 37B, canal 6) o por filtrado (Figura 37B, canal 7) de las suspensiones mostradas en el canal 5 de la figura 37B..

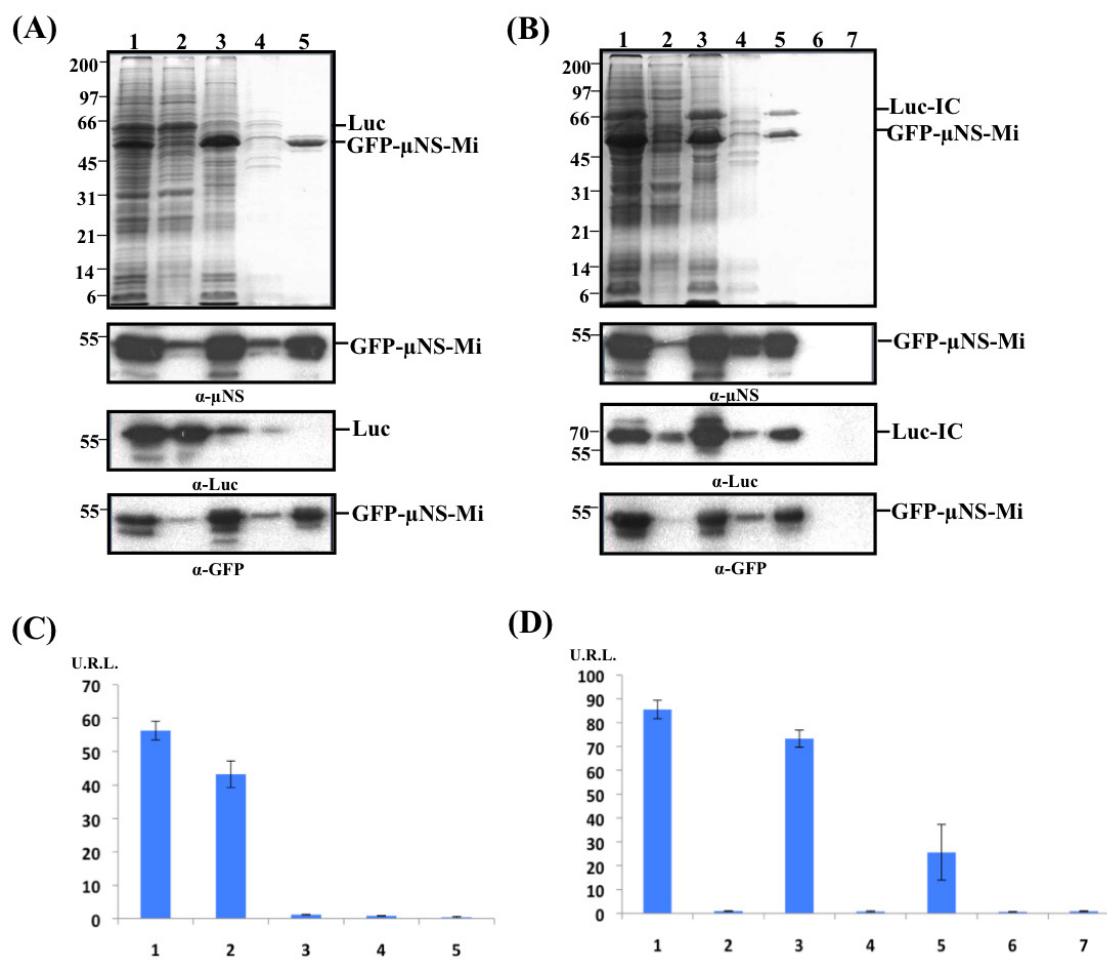


Figura 37. Expresión y purificación de Luciferasa-Intercoil integrada en las inclusiones que forma GFP-μNS-Mi. A- Expresión, purificación y análisis mediante Western-blot de inclusiones de GFP-μNS-Mi co-expresadas con luciferasa. La expresión y purificación de las inclusiones de GFP-μNS-Mi co-expresadas con luciferasa se realizó tal y como se indica en la leyenda de la figura 32A. Todas las muestras se resolvieron en un gel del 12,5 % de SDS-poliacrilamida y las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (panel superior). Muestras de cada uno de los pasos de purificación se analizaron mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra μNS, un anticuerpo monoclonal contra GFP y anticuerpos policlonales contra luciferasa, según se indica en la figura. La posición de GFP-μNS-Mi y luciferasa se indica a la derecha de los paneles y la de los marcadores moleculares a la izquierda. B- Expresión, purificación y análisis mediante Western-blot de luciferasa-Intercoil co-expresada con GFP-μNS-Mi. Los primeros pasos de la purificación se realizaron como se indica arriba. La proteína se eliminó de la suspensión mediante cetrifugación (6) o filtrado usando un filtro de 0,22 μM (7). Todas las muestras se resolvieron en un gel del 12,5 % de SDS-poliacrilamida y las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con de azul de Coomassie (panel de arriba). Muestras de cada uno de los pasos de purificación se analizaron mediante Western-blot usando anticuerpos policlonales contra μNS, un anticuerpo monoclonal contra GFP y anticuerpos policlonales contra luciferasa, según se indica en la figura. La posición de GFP-μNS-Mi y luciferasa-Intercoil se indica a la derecha de los paneles y la de los marcadores moleculares a la izquierda. C y D- Determinación de la actividad de luciferasa. Las barras representan los niveles de actividad de luciferasa de las muestras que se presentan en los geles de la figuras 37A(C) y 37B (D). Las Unidades Relativas de Luz se muestran a la izquierda del diagrama.

Para demostrar que la luciferasa asociada a las inclusiones sigue siendo activa, se tomaron muestras de cada uno de los pasos de la purificación, tanto del control negativo (GFP-μNS-Mi/Luc) como de la muestra objeto de estudio (GFP-μNS-Mi/ILuc-

IC) y se midió su actividad con un luminómetro tal y como se indica en Métodos. En el control negativo (Figura 37C) se observa que la actividad de la luciferasa se va perdiendo a medida que se avanza en el proceso de purificación, hasta llegar al pellet final purificado en donde ya no se detecta actividad (Figura 37C, 5), lo que se corresponde con los datos mostrados tanto en el gel teñido como en el Western-blot contra la luciferasa (Figura 37A, panel α -Luc). Por el contrario, en el caso de la luciferasa etiquetada con el dominio Intercoil, el pellet final presenta actividad de luciferasa aunque algo menor que la de partida, probablemente debido a que se pierde parte de la proteína a lo largo del proceso de purificación (Figura 37D, 5). Como era de esperar, tras la centrifugación (Figura 37D, 6), o filtrado (Figura 37D, 7), ya no se detecta actividad de luciferasa, lo que demuestra la efectividad de nuestro sistema para eliminar cualquier traza de la enzima de la solución.

6. DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA DETECTAR LA INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS EN EL CITOPLASMA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

El hecho de que podamos dirigir a nuestro antojo proteínas a las inclusiones que forman μ NS y μ NS-Mi tiene múltiples aplicaciones potenciales, además de para purificar proteínas. Una de esas aplicaciones sería identificar interacciones entre proteínas en el interior de células eucariotas. Así, si etiquetamos una proteína con el dominio Intercoil para dirigirla a los cuerpos de inclusión, ésta podrá atraer a otras proteínas que interaccionasen fuertemente con ella y reclutarlas a las inclusiones. Para comprobar la eficacia de nuestro método decidimos analizar la interacción entre p53 y el antígeno T del virus SV40, ya que estas dos proteínas interaccionan fuertemente entre sí en el interior de la célula y dicha interacción está muy bien caracterizada (Ali *et al.*, 2001). De hecho, esta pareja constituye el control positivo de otros métodos conocidos para detectar interacciones entre proteínas, como el sistema del doble híbrido adaptado a células de mamífero (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia). Para investigar esa interacción con nuestro sistema, etiquetamos la proteína p53 con el dominio Intercoil y comprobamos: i) si la proteína p53 etiquetada con Intercoil se recluta eficientemente a

las inclusiones de μ NS; y ii) si es capaz de atraer a las inclusiones a su ligando habitual, el antígeno T de SV40 (ver esquema de la Figura 38).

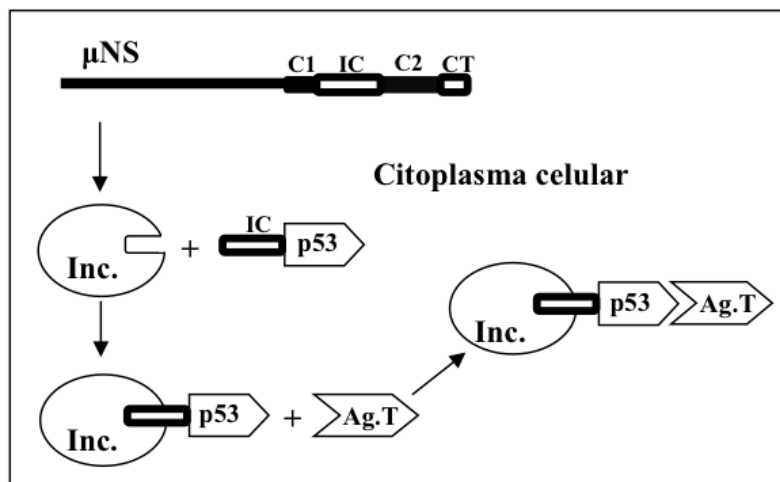


Figura 38. Esquema de la estrategia utilizada para usar las inclusiones de μ NS como una plataforma para detectar asociaciones de proteínas en el interior de células eucariotas. La proteína μ NS está representada esquemáticamente por una línea horizontal negra, seguida de los cuatro dominios presentes en la región C-terminal (μ NS-Mi) que están representados como rectángulos (el Coil 1 o C1; el Intercoil o IC; el Coil 2 o C2 y la C-tail o CT). La proteína μ NS forma inclusiones (Inc.) en el citoplasma celular e incorpora a ellas a p53 etiquetada con la región Intercoil (IC). La p53-Intercoil secuestrada en las inclusiones sirve como cebo para reclutar a su ligando el antígeno T del SV40 (Ag.T).

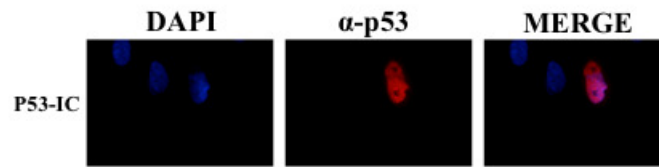
6.1. Las proteínas μ NS y GFP- μ NS reclutan eficientemente a p53-Intercoil

El primer paso para el desarrollo de nuestro sistema fue construir un plásmido que expresa la proteína p53 humana fusionada en su extremo carboxilo al dominio Intercoil (p53-IC). La identidad de dicha construcción se confirmó mediante la secuenciación de su plásmido de expresión y mediante análisis por Western-blot, usando anticuerpos contra μ NS y p53 (datos no mostrados). Para determinar la distribución intracelular de p53-Intercoil, células CEF se transfectaron con el plásmido p53-Intercoil y, 18 h más tarde, las células se fijaron y se analizaron por inmunofluorescencia usando anticuerpos contra p53. La proteína de fusión p53-Intercoil se localizaba principalmente en el núcleo, su localización habitual (Figura 39A). Este resultado demuestra que la fusión del dominio Intercoil al extremo carboxilo de p53 no modifica su localización intracelular. A continuación, co-expresamos las proteínas p53 y μ NS, y analizamos su distribución intracelular mediante inmunofluorescencia. p53 se localizaba principalmente en el núcleo y no en las inclusiones citoplasmáticas formadas

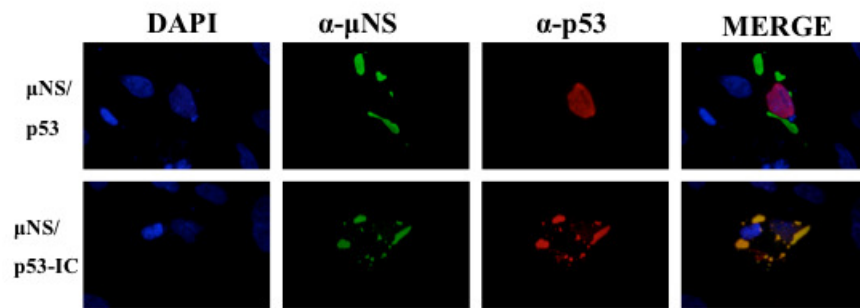
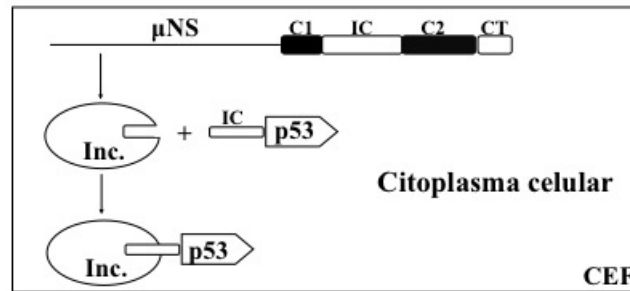
por μ NS (Figura 39B, paneles de arriba). Este resultado demuestra: i) que p53 no se asocia con los cuerpos de inclusión; y ii) que el anticuerpo específico contra p53 no reconoce a μ NS. Sin embargo, en las células que co-expresan p53-Intercoil y μ NS, p53 se localiza mayoritariamente en las inclusiones, aunque en muchas células una pequeña parte de p53 permanece en el núcleo (Figura 39B, paneles de abajo).

Posteriormente repetimos el experimento utilizando GFP- μ NS en vez de μ NS, ya que tiene la ventaja de que no se requieren anticuerpos para detectar las inclusiones y en apartados anteriores hemos demostrado que la fusión de la proteína GFP no afecta a la formación de inclusiones por parte de μ NS. Como en el caso anterior, p53 permanece en el núcleo cuando se co-expresa con GFP- μ NS, lo que demuestra: i) que p53 no se asocia con las inclusiones de GFP- μ NS y; ii) que el anticuerpo específico contra p53 no reconoce a las inclusiones formadas por GFP- μ NS (Figura 39C, paneles de arriba). Sin embargo, en las células que co-expresan p53-Intercoil y GFP- μ NS, la p53 se localizaba mayoritariamente en las inclusiones (Figura 39C, paneles de abajo), demostrando al igual que en el caso anterior, que la incorporación de p53 a las inclusiones formadas por GFP- μ NS no afecta a la integridad de las mismas.

(A)



(B)



(C)

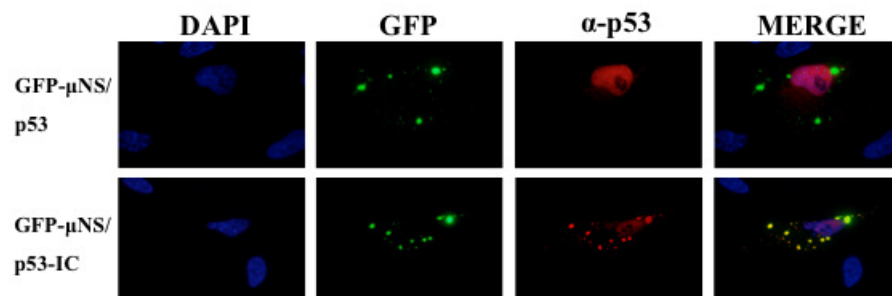
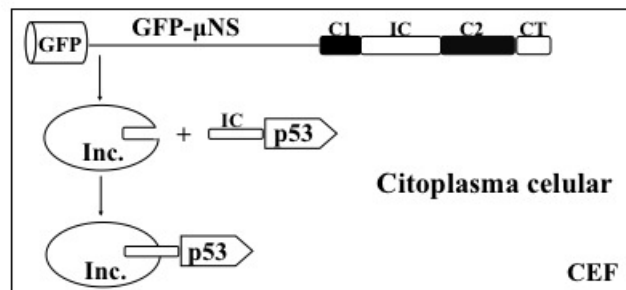


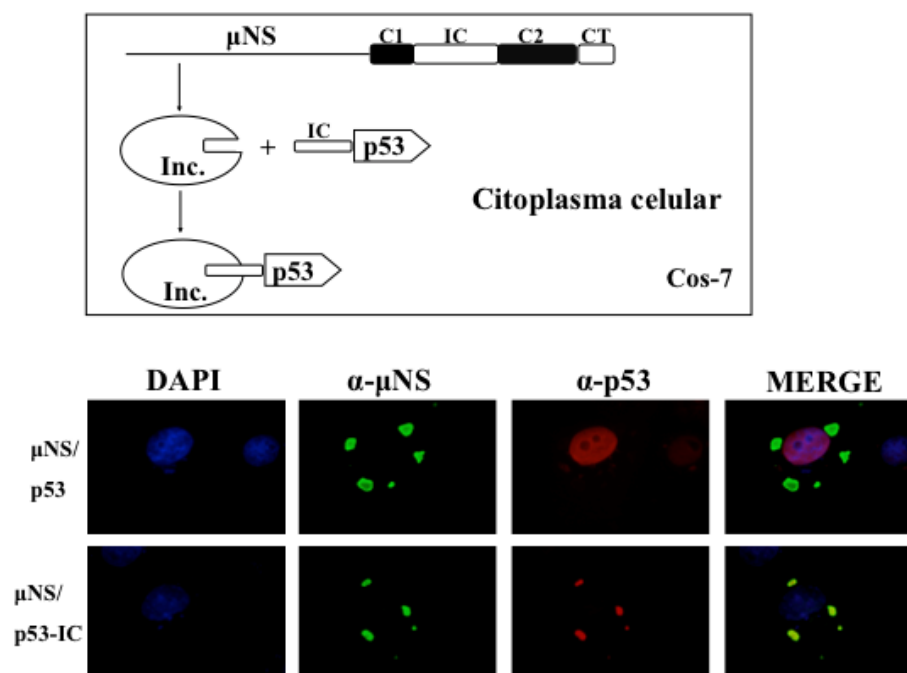
Figura 39. Distribución intracelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de las inclusiones que forman μNS y GFP-μNS. A- Localización subcelular de p53-Intercoil. Células CEF semiconfluentes se transfectoraron con el plásmido que expresa la quimera p53-Intercoil (p53-IC). Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmovifluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal

contra p53 (rojo). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. B- Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por μ NS. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 (rojo) y anticuerpos policlonales contra μ NS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. C- Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por GFP- μ NS. Igual que en B, pero en este caso la GFP- μ NS se visualizó directamente (verde). Encima de los paneles se representa un esquema de los resultados de las inmunofluorescencias.

6.2. La presencia de p53-Intercoil en las inclusiones que forma μ NS atrae a ellas a su ligando el antígeno T de SV40 de células Cos-7

A continuación decidimos comprobar si la relocalización de p53 a las inclusiones de μ NS provoca también la relocalización de ligandos conocidos de dicha proteína. Para ello utilizamos células Cos-7, que tienen integrada una copia del genoma de SV40 y que por lo tanto expresan ese antígeno (Ag.T) (Gluzman, 1981), el cual se localiza mayoritariamente en el núcleo (Kalderon *et al.*, 1985). p53 se localiza exclusivamente en el núcleo de células Cos-7 cuando se co-expresa con μ NS (Figura 40A, paneles de arriba) o con GFP- μ NS (Figura 40B, paneles de arriba). Sin embargo, p53-Intercoil se localiza mayoritariamente en las inclusiones formadas por μ NS o GFP- μ NS (Figura 40A y 40B, paneles de abajo), lo que demuestra que el sistema para reclutar proteínas a inclusiones de μ NS funciona perfectamente en diferentes tipos celulares. A continuación comprobamos que en las células COS-7, donde expresamos p53 y μ NS o GFP- μ NS, el antígeno T se encuentra exclusivamente en el núcleo, que es su localización habitual (Figura 41A y 41B, paneles de arriba). Estos resultados demuestran: i) que el antígeno T no se asocia con las inclusiones; y ii) que el anticuerpo específico contra el antígeno T no reconoce a las inclusiones. Sin embargo, en células Cos-7 que expresan p53-Intercoil en presencia de μ NS o GFP- μ NS, el antígeno T pasa a detectarse mayoritariamente en las inclusiones citoplasmáticas, a pesar de que una pequeña parte permanece en el núcleo (Figura 41A y 41B paneles de abajo). Este resultado demuestra: i) que el antígeno T es reclutado a las inclusiones por asociación con p53; ii) la incorporación del antígeno T a los cuerpos de inclusión por asociación con p53 no afecta a la integridad de los mismos; y iii) nuestro sistema de etiquetado con el dominio Intercoil se puede utilizar como una plataforma para ver si dos proteínas interaccionan entre sí en el citoplasma de células eucariotas, incluso cuando las proteínas problema son proteínas nucleares.

(A)



(B)

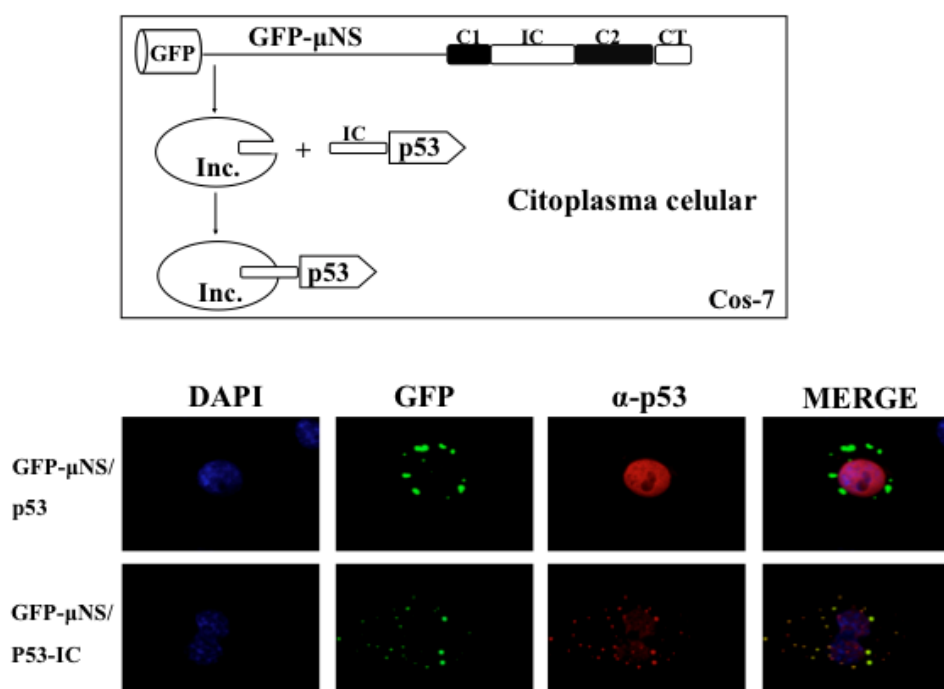
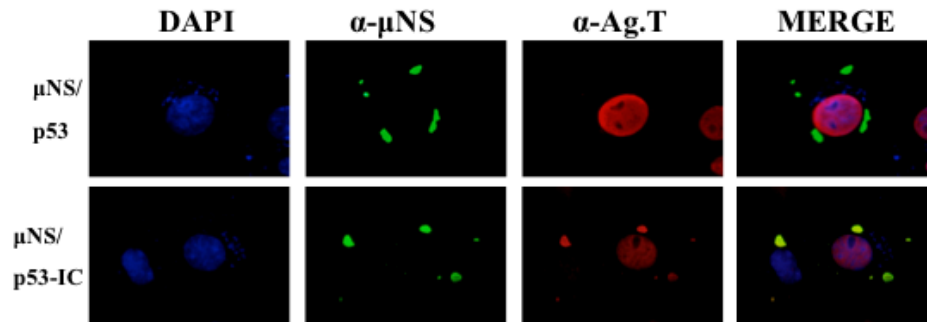
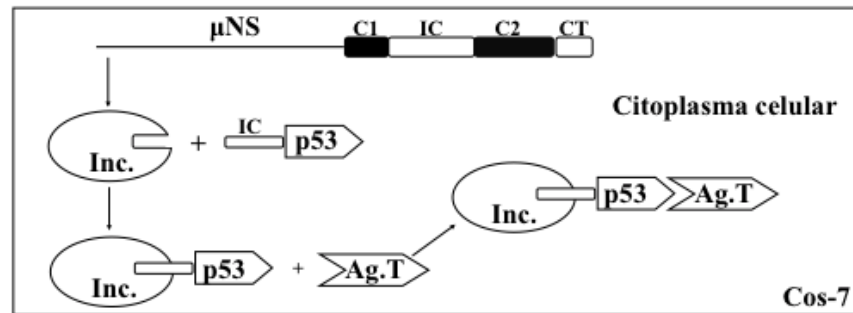


Figura 40. Distribución intracelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de las inclusiones que forman μ NS y GFP- μ NS en células Cos-7. A- Localización subcelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de las inclusiones formadas por μ NS. Células Cos-7 semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra p53 (rojo) y contra μ NS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. B- Localización subcelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por GFP- μ NS. Igual que en A, pero en este caso la GFP- μ NS se visualizó directamente (verde). Encima de los paneles se representa un esquema de los resultados de las inmunofluorescencias.

(A)



(B)

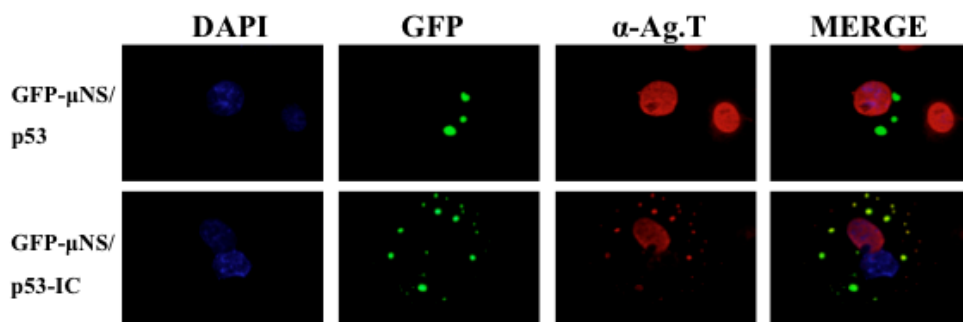
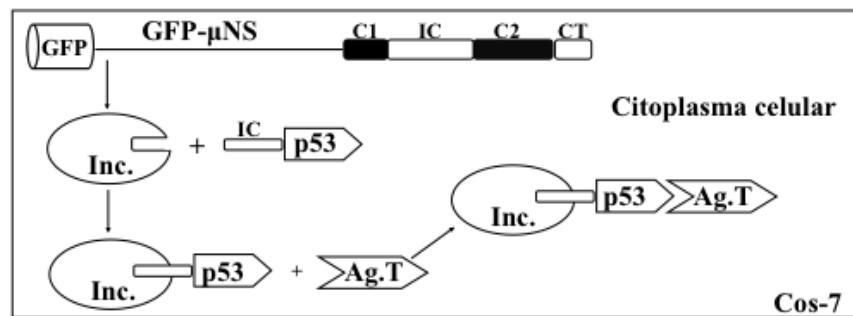


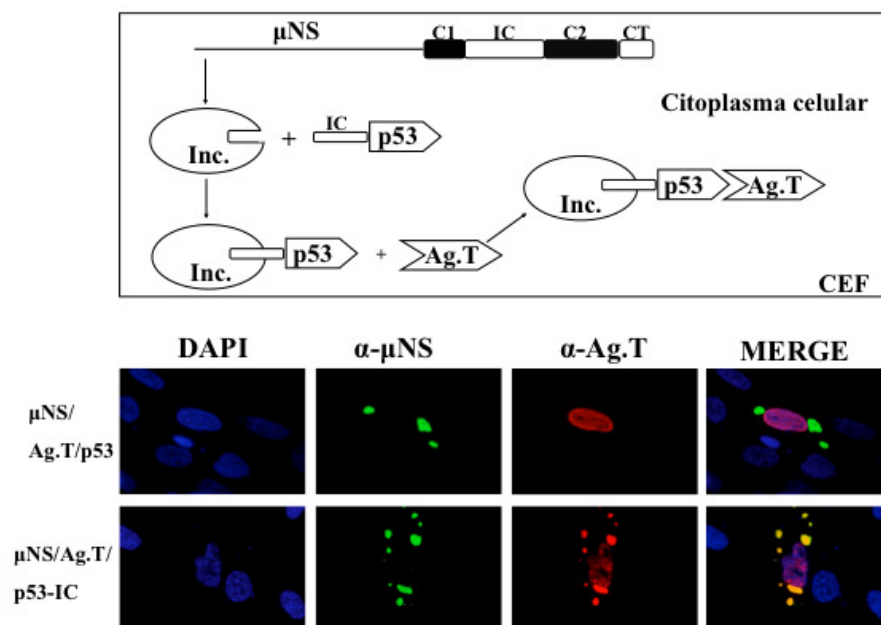
Figura 41. Distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de μ NS y GFP- μ NS co-expresadas con p53 y p53-Intercoil en células Cos-7. A- Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan μ NS y p53 o μ NS y p53-Intercoil. Células Cos-7 semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno T (rojo), y anticuerpos policlonales contra μ NS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. B- Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan GFP- μ NS y p53 o GFP- μ NS y p53-Intercoil. Igual que en A, pero en este caso la GFP- μ NS se visualizó directamente (verde). Encima de los paneles se representa un esquema de los resultados de las inmunofluorescencias.

6.3. La presencia de p53-Intercoil en las inclusiones que forma μ NS atrae a ellas al antígeno T de SV40 expresado en células CEF

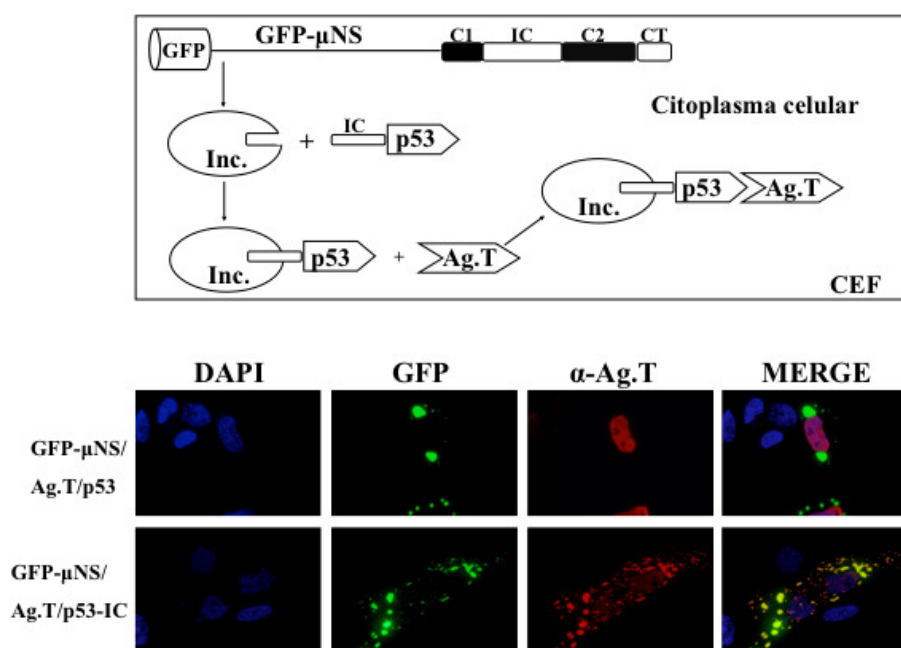
Una vez demostrado que p53 es capaz de atraer a las inclusiones al antígeno T expresado endógenamente por las células Cos-7, decidimos investigar si nuestro sistema también funcionaría con el antígeno T foráneo, expresado mediante transfección de su gen en células que no lo expresan, como las células CEF. Esto tiene la dificultad teórica añadida de que para que el sistema funcione tienen que entrar tres plásmidos distintos en la misma célula. Sin embargo, aunque todavía no existe una explicación al respecto, se sabe que al realizar co-transfecciones con múltiples plásmidos, una célula incorpora todos los plásmidos o ninguno. Actualmente existen numerosos ejemplos de técnicas que se basan en la co-transfección de múltiples plásmidos, como el sistema del doble híbrido para células de mamífero (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia), o los sistemas de genética reversa desarrollados para reovirus, orbivirus, etc (Kobayashi *et al.*, 2007; Boyce *et al.*, 2008).

Como en el caso anterior de células Cos-7, el antígeno T expresado a partir de plásmidos se localiza exclusivamente en el núcleo de células CEF en donde se co-expresa junto con μ NS y p53 o con GFP- μ NS y p53 (Figura 42A y 42B, paneles de arriba). Sin embargo, al sustituir p53 por p53-Intercoil, el antígeno T pasa a localizarse mayoritariamente en las inclusiones citoplasmáticas (Figura 42A y 42B, paneles de abajo), lo que vuelve a demostrar la validez de este sistema para estudiar interacciones entre proteínas, tanto de las endógenas como de las expresadas mediante el uso de plásmidos recombinantes. Como control para demostrar que el anticuerpo contra el antígeno T no reconoce a p53, se expresó la construcción p53-Intercoil y se detectó usando anticuerpos contra μ NS y antígeno T. p53-Intercoil reaccionó con anti- μ NS pero no con el anticuerpo contra el antígeno T, tal como era de esperar (Figura 42C).

(A)



(B)



(C)

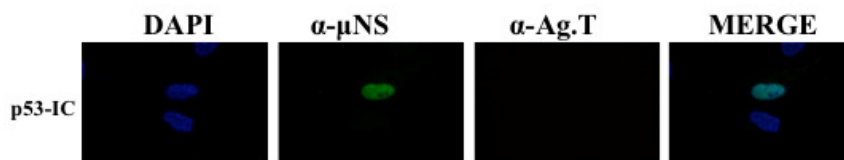


Figura 42. Distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de μNS y GFP-μNS co-expresadas con p53 y p53-Intercoil en células CEF. A-Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan μNS y p53 o μNS y p53-Intercoil. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra el antígeno T (rojo) y contra μNS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. B-Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan GFP-μNS y p53 o GFP-μNS y p53-

Intercoil. Igual que en A, pero en este caso la GFP- μ NS se visualizó directamente (verde). C- Localización subcelular de p53-Intercoil en células CEF. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con el plásmido que expresa la quimera p53-Intercoil. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra el antígeno T (rojo) y contra μ NS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

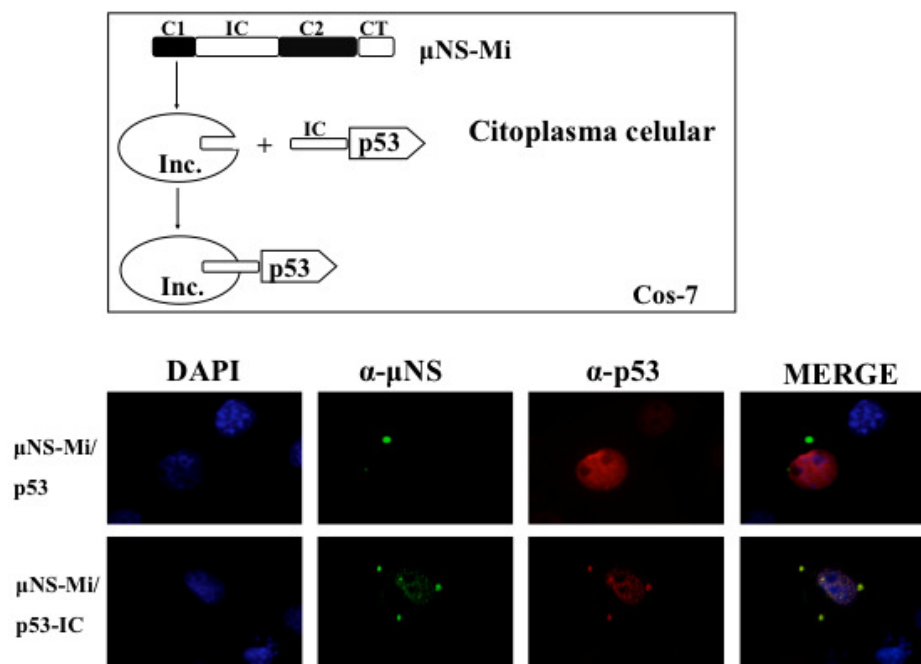
6.4. μ NS-Mi y su versión fusionada con GFP reclutan eficientemente a p53-Intercoil y permiten detectar la asociación p53-antígeno T

Para poder disponer de un sistema alternativo, decidimos comprobar si el sistema de detección de interacciones entre proteínas funciona también al sustituir μ NS y GFP- μ NS por μ NS-Mi y GFP- μ NS-Mi. Para ello la metodología a seguir fue la misma que empleamos para el caso de la μ NS/GFP- μ NS, es decir, estudiamos la interacción de p53 con el antígeno T tanto en células Cos-7 como en células CEF.

i) Ag.T endógeno en células Cos-7

Como en el caso de μ NS, p53 se detecta exclusivamente en el núcleo de las células Cos-7 y no en las inclusiones formadas por μ NS-Mi en las células que co-expresan μ NS-Mi y p53 (Figura 43A, paneles de arriba); demostrando que: i) que p53 no se asocia a los cuerpos de inclusión formados por μ NS-Mi y ii) que el anticuerpo contra p53 no reconoce a las inclusiones formadas por μ NS-Mi. Sin embargo, al sustituir p53 por p53-Intercoil, p53 se localizaba mayoritariamente en las inclusiones (Figura 43A, paneles de abajo), demostrando que su incorporación a los cuerpos de inclusión no afecta a la integridad de los mismos. Hay que destacar que en este caso se observó la presencia de inclusiones nucleares y citoplasmáticas, lo cual puede deberse a que la p53-Intercoil arrastre a la μ NS-Mi al núcleo, debido a su pequeño tamaño y a la presencia de señales de localización nuclear en p53. A continuación, repetimos el proceso utilizando GFP- μ NS-Mi, evitando así el uso de anticuerpos contra μ NS. Como en el caso anterior, p53 se mantenía en el núcleo cuando se co-expresaba con GFP- μ NS-Mi, lo que demostraba: i) que p53 no se asocia con las inclusiones; y ii) que el anticuerpo específico contra p53 no reconoce a los cuerpos de inclusión que forma GFP- μ NS-Mi (Figura 43B, paneles de arriba). Al sustituir p53 por p53-Intercoil, p53 se localiza casi exclusivamente en las inclusiones (Figura 43B, paneles de abajo), demostrando que la incorporación de p53 a las inclusiones formadas por GFP- μ NS-Mi no afecta a la formación/integridad de las mismas.

(A)



(B)

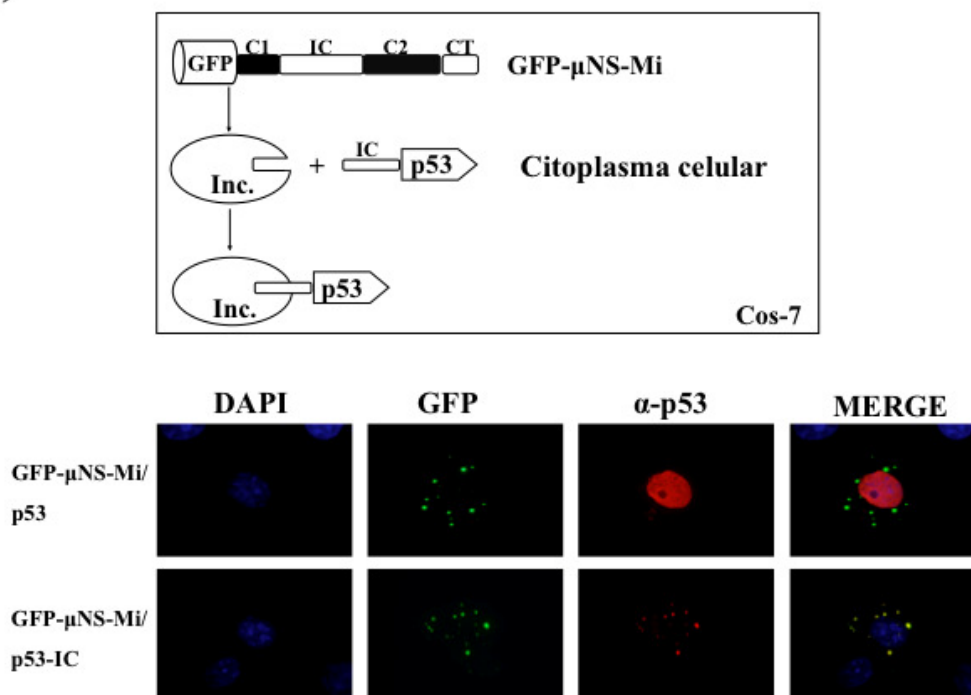
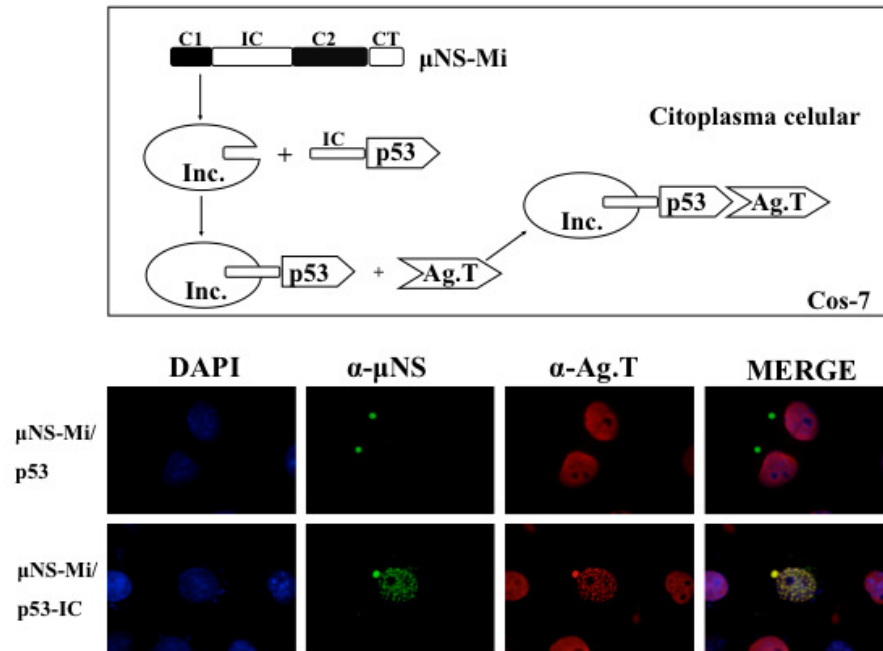


Figura 43. Distribución intracelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de las inclusiones que forman μ NS-Mi y GFP- μ NS-Mi en células Cos-7. A- Localización subcelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por μ NS-Mi. Células Cos-7 semiconfluentes se transfectoraron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra p53 (rojo) y contra μ NS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. B- Localización subcelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por GFP- μ NS-Mi. Igual que en A, pero en este caso la GFP- μ NS-Mi se visualizó directamente (verde). Encima de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia.

Seguidamente analizamos la distribución del Ag.T en células Cos-7 que co-expresan p53-Intercoil y μ NS-Mi o GFP- μ NS-Mi. Cuando se expresa p53 en presencia de μ NS-Mi o GFP- μ NS-Mi, el antígeno T se localiza exclusivamente en el núcleo (Figura 44A y 44B paneles de arriba); demostrando: i) que el antígeno T no se asocia con las inclusiones que forma μ NS-Mi; y ii) que el anticuerpo específico contra el antígeno T no reconoce a las inclusiones de μ NS-Mi. Por contra, al sustituir p53 por p53-Intercoil, el antígeno T pasa a localizarse mayoritariamente en las inclusiones (Figura 44A y 44B paneles de abajo). Al igual que antes, se observaron inclusiones nucleares al utilizar μ NS-Mi. Estos resultados demuestran: i) que la incorporación del antígeno T a los cuerpos de inclusión de μ NS-Mi por asociación con p53 no afecta a la integridad/formación de los mismos; y ii) que las inclusiones formadas por μ NS-Mi o GFP- μ NS-Mi pueden utilizarse como una plataforma para ver si dos proteínas interaccionan entre sí en el citoplasma.

(A)



(B)

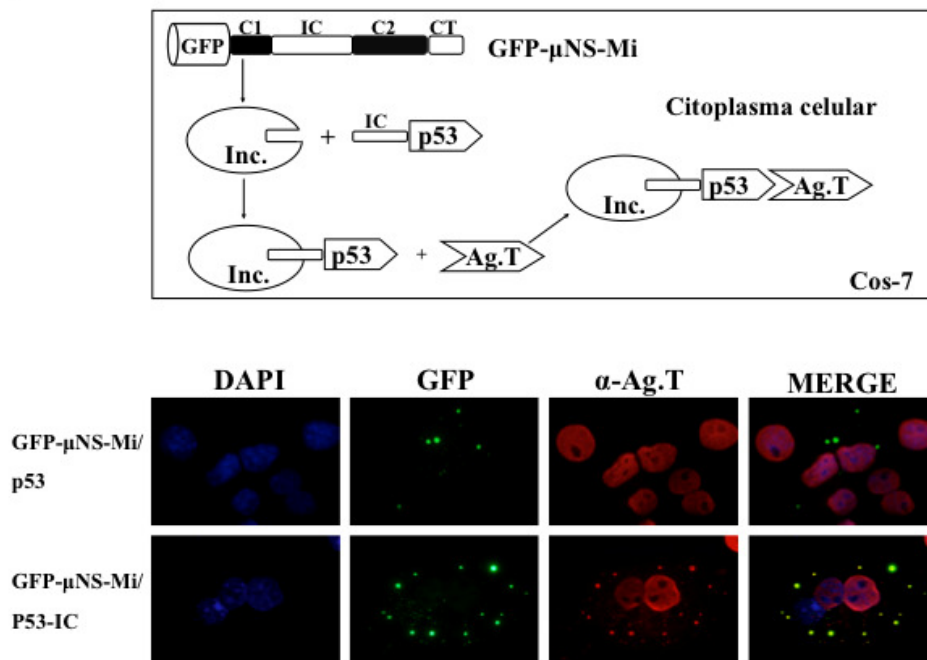
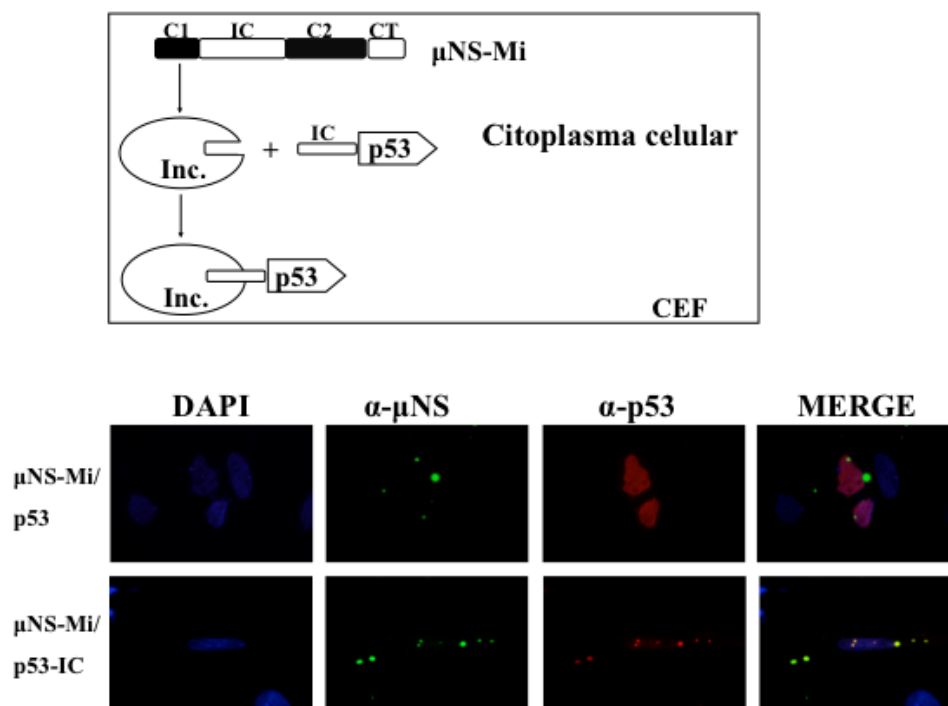


Figura 44. Distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de μ NS-Mi o GFP- μ NS-Mi co-expresadas con p53 o p53-Intercoil en células Cos7. A- Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan μ NS-Mi y p53 o μ NS-Mi y p53-Intercoil. Células Cos-7 semiconfluente se co-transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra el antígeno T (rojo) y contra μ NS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. B- Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan GFP- μ NS-Mi y p53 o GFP- μ NS-Mi y p53-Intercoil. Igual que en A, pero en este caso la GFP- μ NS-Mi se visualizó directamente (verde). Encima de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia.

ii) Ag.T expresado con plásmidos en células CEF

Al igual que hicimos con μ NS decidimos estudiar la interacción entre p53 y el antígeno T exógeno expresado a partir de plásmidos utilizando μ NS-Mi como plataforma. Para ello, células CEF se transfectaron con cada una de las construcciones y se analizó su distribución mediante inmunofluorescencia. De nuevo, p53 se localiza exclusivamente en el núcleo de las células que co-expresaban μ NS-Mi o GFP- μ NS-Mi y no en las inclusiones (Figura 45A y 45B paneles de arriba). Sin embargo, al sustituir p53 por p53-Intercoil, ésta se detecta mayoritariamente en las inclusiones (Figura 45A y 45B paneles de abajo). Como en el caso de las células Cos-7 se observó la presencia de inclusiones nucleares y citoplasmáticas. Además, el antígeno T se localizó exclusivamente en el núcleo de células que co-expresan p53 y μ NS-Mi o GFP- μ NS-Mi (Figura 46A y 46B, paneles de arriba). Sin embargo, sustituyendo p53 por p53-Intercoil, el antígeno T pasa a localizarse mayoritariamente en los cuerpos de inclusión citoplasmáticos y nucleares (Figura 46A y 46B, paneles de abajo).

(A)



(B)

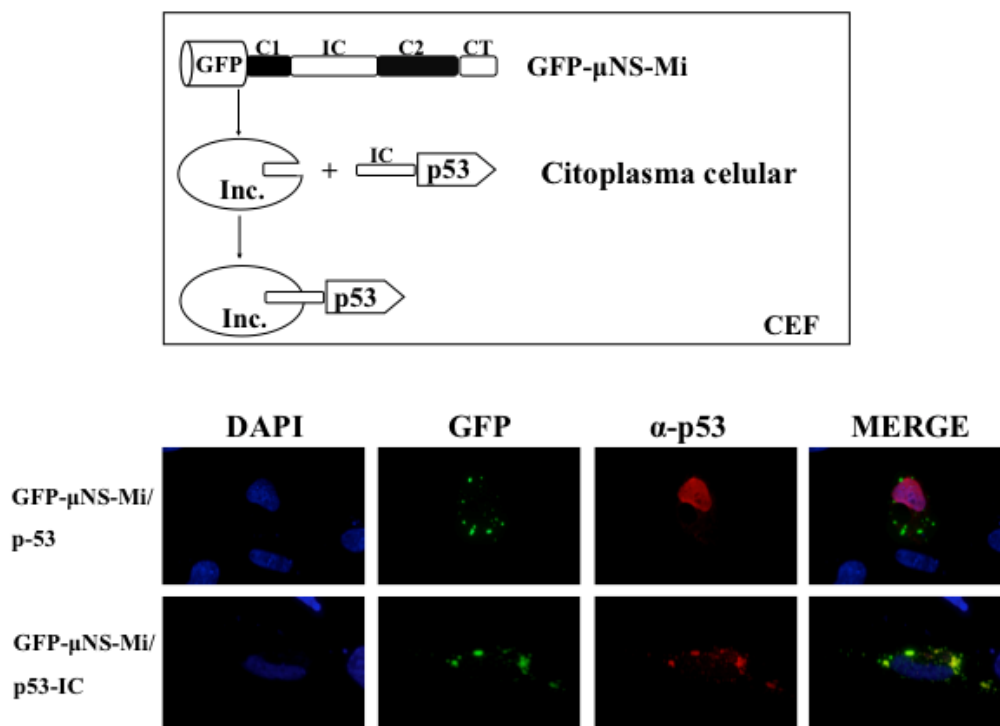
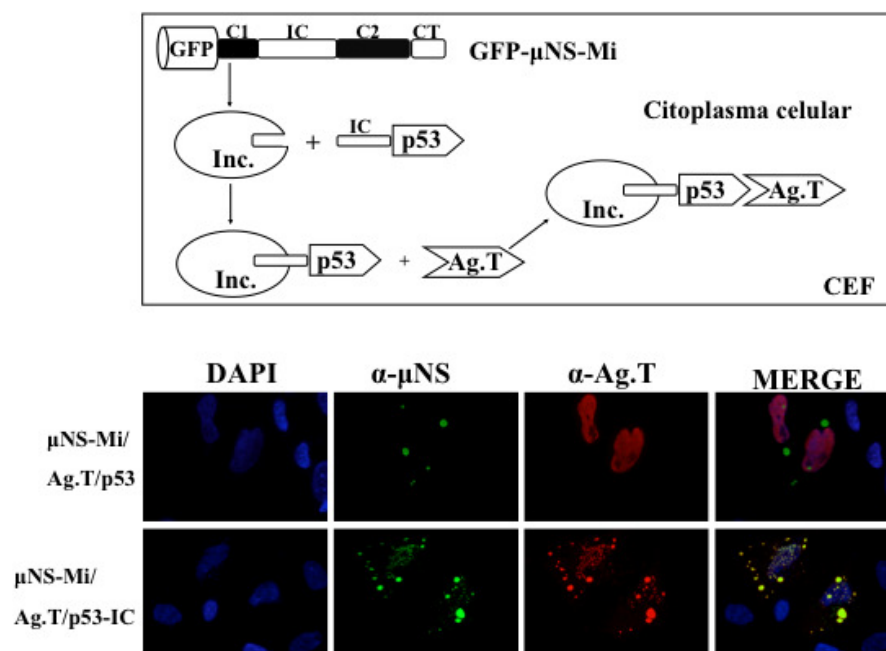


Figura 45. Distribución intracelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de las inclusiones que forman $\mu\text{NS-Mi}$ y GFP- $\mu\text{NS-Mi}$ en células CEF. A- Localización subcelular de p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por $\mu\text{NS-Mi}$. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra p53 (rojo) y contra μNS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. B- Localización subcelular de

p53 o p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por GFP- μ NS-Mi. Igual que en A, pero en este caso la GFP- μ NS-Mi se visualizó directamente (verde). Encima de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia.

(A)



(B)

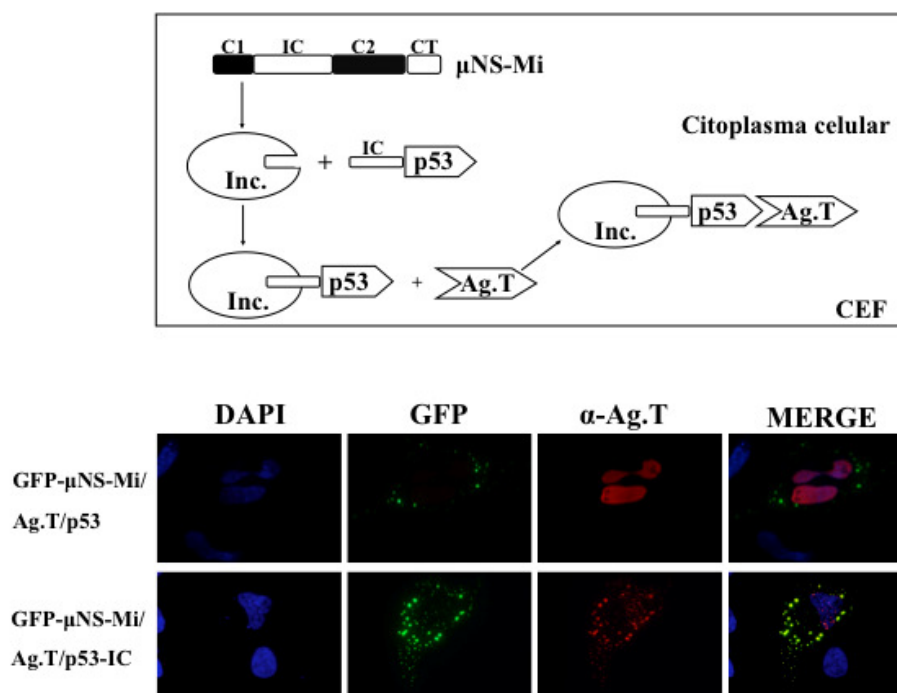


Figura 46. Distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de μ NS-Mi o GFP- μ NS-Mi co-expresadas con p53 o p53-Intercoil en células CEF. A- Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan μ NS-Mi y p53 o μ NS-Mi y p53-Intercoil. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra el antígeno T (rojo) y contra μ NS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul

con DAPI. B- Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan GFP- μ NS-Mi y p53 o GFP- μ NS-Mi y p53-Intercoil. Igual que en A, pero en este caso la GFP- μ NS-Mi se visualizó directamente (verde). Encima de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia.

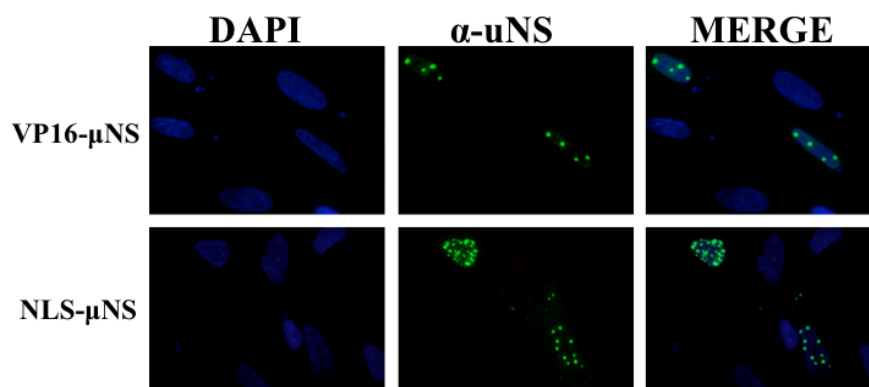
7. μ NS PUEDE FORMAR INCLUSIONES NUCLEARES

La aparición de pequeñas inclusiones nucleares al utilizar nuestro sistema con μ NS-Mi y proteínas nucleares (p53 y Ag. T) nos hizo pensar que se podría adaptar nuestro sistema de secuestro y de detección de interacciones entre proteínas al núcleo celular, y de esta manera resultaría un método más natural para ser empleado con proteínas nucleares. Nuestro primer objetivo fue intentar generar versiones de μ NS que formasen inclusiones nucleares. Para ello seguimos dos estrategias diferentes: i) por un lado, le fusionamos a μ NS secuencias de localización nuclear (NLS) cortas (la NLS del antígeno T (PKKKRKV, Kalderon *et al.*, 1984) y la NLS de la proteína p17 del reovirus aviar (IAAKRGRQLD, Costas *et al.*, 2005); y ii) por otra parte, fusionamos μ NS al dominio de activación usado en el sistema del híbrido doble de células de mamífero (Mammalian Matchmaker, Clontech, Saint Germain en Laye, Francia) que contiene la NLS del Ag.T fusionada a la proteína VP16 del virus Herpes, por si no funcionasen las NLS cortas.. La identidad de cada construcción se comprobó mediante secuenciación y Western-blot (datos no mostrados). Para determinar la distribución intracelular de cada una de las construcciones, se transfectaron células CEF con cada uno de los plásmidos y, a las 18 h.p.t, las células se fijaron y sometieron a inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales contra μ NS. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: i) la proteína de fusión VP16- μ NS dio lugar a la formación de inclusiones nucleares en la mayoría de las células (Figura 47A, paneles de arriba); ii) la μ NS fusionada a la NLS del antígeno T (NLS- μ NS) en su extremo amino dio lugar a inclusiones nucleares en la mayoría de las células, aunque en algunas células se detectaron también algunas inclusiones en el citoplasma (Figura 47A, paneles de abajo); iii) la fusión a la NLS de p17 no produjo inclusiones nucleares (datos no mostrados). En vista de estos resultados intentamos desarrollar el sistema con las construcciones VP16- μ NS y NLS- μ NS.

También intentamos dirigir μ NS-Mi al núcleo para formar allí cuerpos de inclusión. Sin embargo, al contrario que con μ NS, la construcción VP16- μ NS-Mi no dio

lugar a inclusiones nucleares, sino que se distribuía de forma difusa por todo el núcleo (resultados no mostrados). Además, la introducción de las diferentes NLS (la del antígeno T y la de p17 de reovirus aviar) en el extremo amino de μ NS-Mi tampoco originó cuerpos de inclusión nucleares (datos no mostrados). Estos resultados negativos quizá puedan deberse a que la proximidad entre la NLS añadida (carácter fuertemente básico) y el primer “coiled-coil” (altamente hidrofóbico) afecte al correcto plegamiento de μ NS-Mi.

(A)



(B)

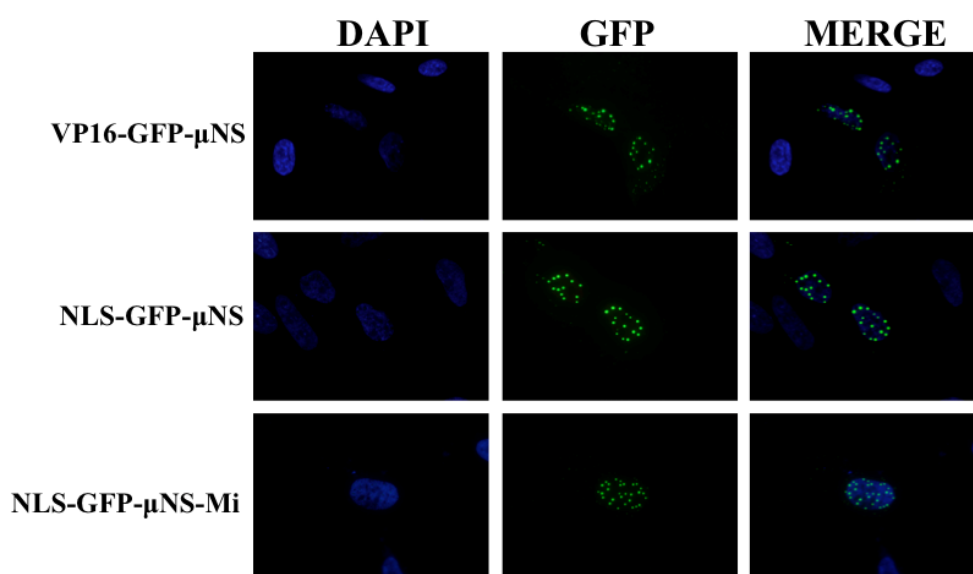


Figura 47. Localización subcelular de las inclusiones que forman diferentes quimeras de μ NS y μ NS-Mi. A- Distribución intracelular de VP16- μ NS y NLS- μ NS. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales contra μ NS (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). B- Distribución intracelular de VP16-GFP- μ NS, NLS-GFP- μ NS y NLS-GFP- μ NS-Mi. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia. Las construcciones con GFP se ven en verde. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

Como hemos mencionado antes, la fusión de GFP al extremo amino de μ NS y μ NS-Mi no afecta a su capacidad de formar inclusiones, y tiene la ventaja de que no se requieren anticuerpos para detectar su distribución intracelular. Teniendo en cuenta esto, decidimos intentar generar inclusiones fluorescentes nucleares siguiendo las siguientes estrategias: i) fusionando VP16 a GFP- μ NS o GFP- μ NS-Mi; y ii) introducir la NLS del antígeno T en el extremo amino de las quimeras GFP- μ NS y GFP- μ NS-Mi. Las

diferentes proteínas de fusión, VP16-GFP- μ NS, NLS-GFP- μ NS y NLS-GFP- μ NS-Mi, originaron cuerpos de inclusión nucleares en la mayoría de las células (Figura 47B). En el caso de VP16-GFP- μ NS-Mi no originó inclusiones nucleares (datos no mostrados). Por otra parte, ninguna de las quimeras de μ NS que forman inclusiones nucleares parecían estar agregadas, ya que no colocalizaban con conjugados de ubiquitina (datos no mostrados).

7.1. Las inclusiones nucleares que forman las diferentes versiones de μ NS capturan a la proteína GFP y al dominio GAL4 etiquetados con el dominio Intercoil

Nuestro siguiente paso fue comprobar si las inclusiones nucleares que forman VP16- μ NS y NLS- μ NS son capaces de reclutar a proteínas etiquetadas con el dominio Intercoil sin afectar a la integridad de las mismas. Para ello, elegimos la proteína GFP y el dominio GAL4, un dominio de unión a DNA que se localiza en el núcleo. Posteriormente, co-transfectamos células CEF con cada una de las construcciones que forman inclusiones nucleares junto con: i) GFP-Intercoil (GFP-IC) o GFP sin etiquetar; y ii) GAL4-Intercoil (GAL4-IC) o GAL4. Las células se fijaron a la 18 h.p.t. y se sometieron a inmunofluorescencia con anticuerpos contra μ NS y contra GAL4 o bien se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia para detectar la distribución intracelular de GFP. La proteína GFP se distribuye de manera difusa por toda la célula al co-expresarla con VP16- μ NS (Figura 48, panel 3) o NLS- μ NS (datos no mostrados). Sin embargo, GFP-Intercoil se localiza casi exclusivamente en las inclusiones que forman la VP16- μ NS (Figura 48, panel 4) y la NLS- μ NS (datos no mostrados). Una situación similar se produjo con GAL4. Este dominio se localiza por todo el núcleo sin co-localizar con NLS- μ NS (Figura 49, paneles del medio) o VP16- μ NS (datos no mostrados). Sin embargo, GAL4-Intercoil se localiza casi exclusivamente en las inclusiones que forman la NLS- μ NS (Figura 49, paneles de abajo) y la VP16- μ NS (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que las inclusiones nucleares descritas en este trabajo son capaces de capturar proteínas etiquetadas con el dominio Intercoil sin alterar la integridad de las inclusiones ni de la proteína incorporada.

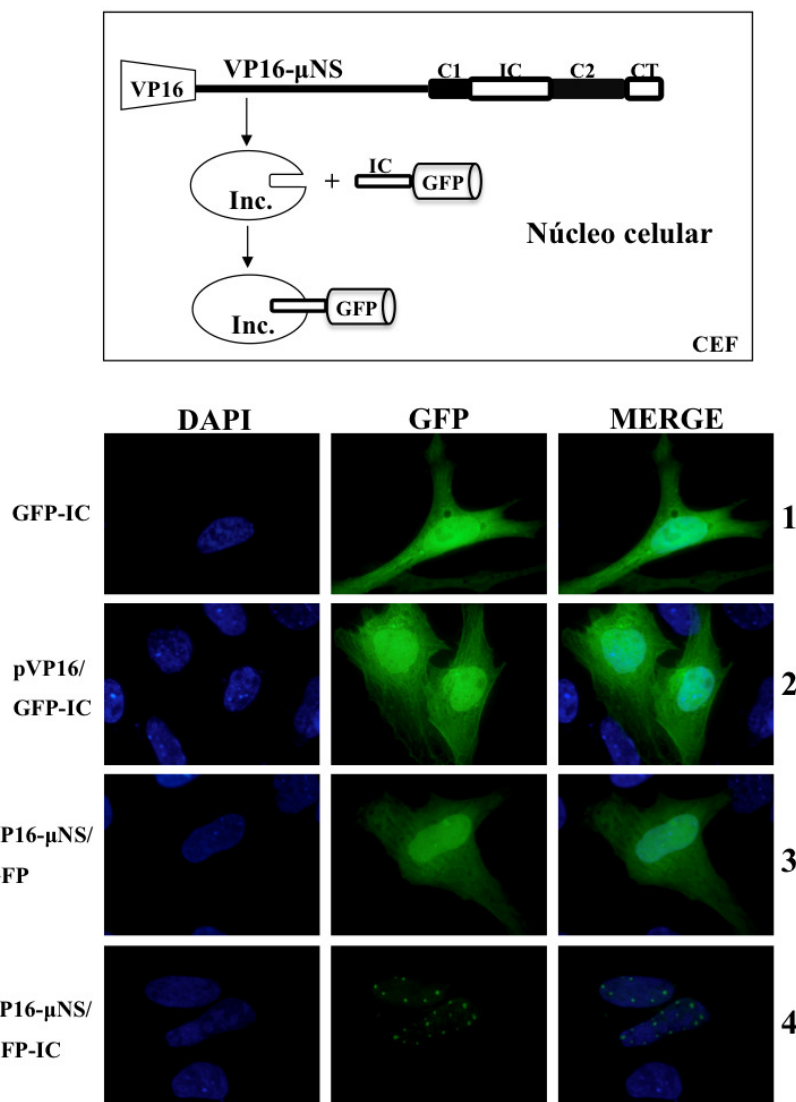


Figura 48. Distribución intracelular de GFP y GFP-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares que forma VP16-μNS. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y se visualizaron directamente con un microscopio de fluorescencia. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. Encima de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia.

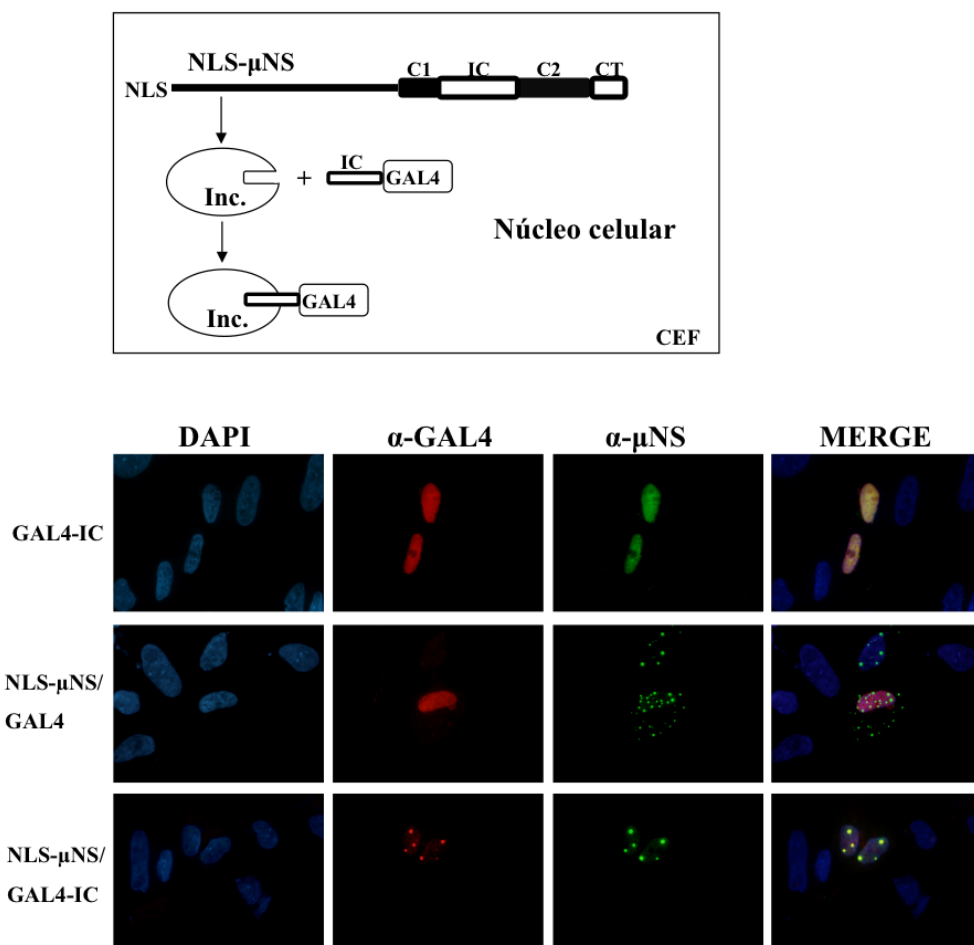


Figura 49. Distribución intracelular de GAL4 y GAL4-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares que forma NLS-μNS. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra GAL4 (rojo) y anticuerpos policlonales contra μNS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. Encima de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia.

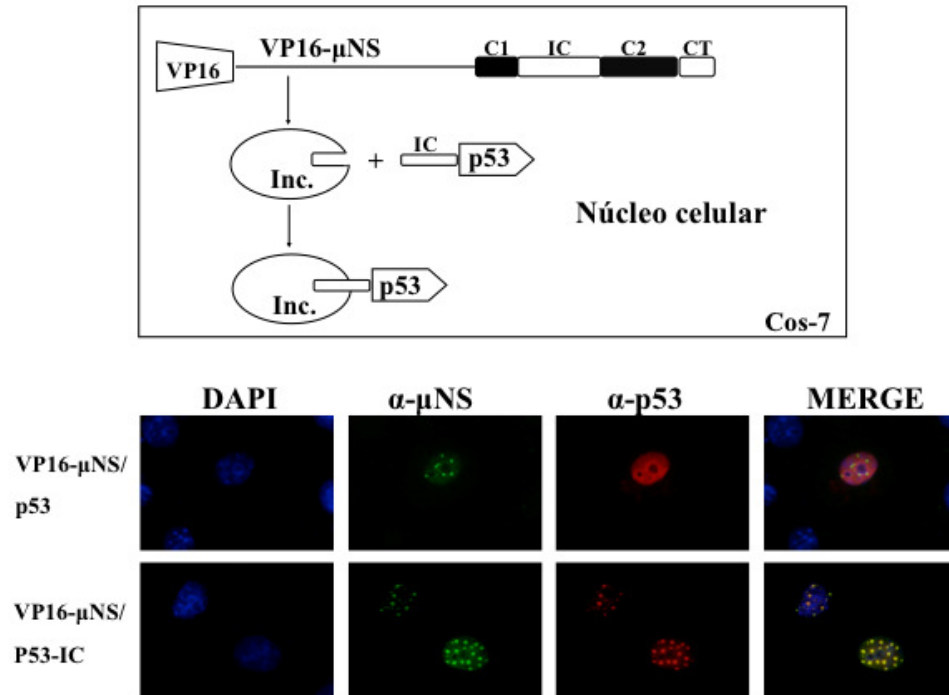
7.2. Las inclusiones nucleares que forman las diferentes versiones de μ NS reclutan eficientemente a p53-Intercoil y permiten detectar la interacción p53-Ag.T en el núcleo

Nuestro objetivo ahora era demostrar que nuestro sistema podía ser utilizado para detectar la interacción entre proteínas en el núcleo celular. Al igual que antes, probamos nuestro sistema con la interacción p53-Ag.T tanto en células Cos-7 (donde el Ag.T se expresa endógenamente) como en células CEF (mediante la expresión transitoria del Ag.T). Dado que disponíamos de varias construcciones con capacidad para formar inclusiones nucleares, pondremos como ejemplos representativos la VP16- μ NS o GFP-VP16- μ NS, ya que se obtuvieron los mismos resultados con el resto de quimeras.

i) Ag.T endógeno en células Cos-7

En el caso de células Cos-7, se observó que p53 se distribuye de forma difusa en el núcleo, sin co-localizar con las inclusiones nucleares que forman las construcciones VP16- μ NS, VP16-GFP- μ NS, NLS- μ NS, NLS-GFP- μ NS o NLS-GFP- μ NS-Mi (Figura 50A y 50B, paneles de arriba y resultados no mostrados), lo que demuestra que: i) p53 no se asocia a las inclusiones nucleares; y ii) el anticuerpo contra p53 no reconoce a las inclusiones nucleares. Sin embargo, p53-Intercoil se localizaba casi exclusivamente en las inclusiones en la mayoría de las células (Figura 50A y 50B, paneles de abajo y resultados no mostrados) por lo que la incorporación de p53-Intercoil no afecta a la integridad de las inclusiones.

(A)



(B)

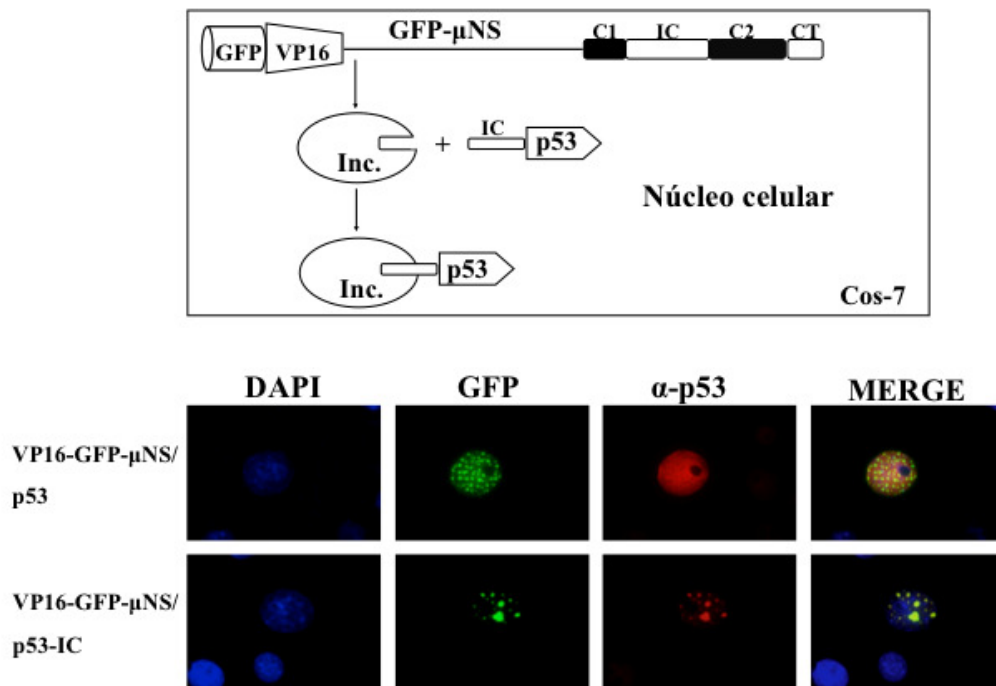
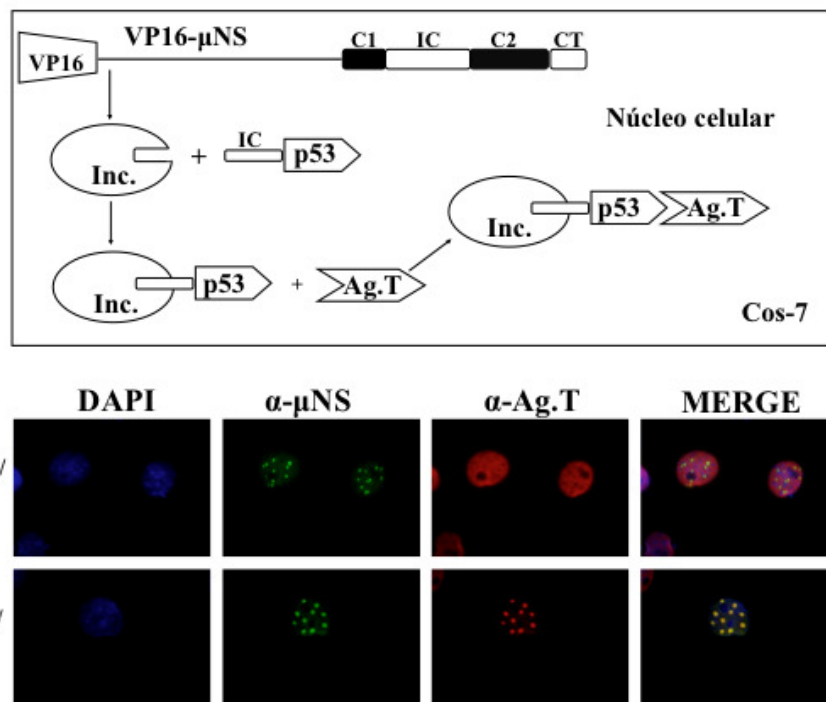


Figura 50. Distribución intracelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares que forman VP16-μNS y VP16-GFP-μNS en células Cos-7. A- Localización subcelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por VP16-μNS. Células Cos-7 semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra p53 (rojo) y contra μNS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI. B- Localización subcelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de inclusiones formadas por VP16-GFP-

μ NS. Igual que en A, pero en este caso la VP16-GFP- μ NS se visualizó directamente (verde). Encima de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia.

La interacción entre p53 y el antígeno T se analizó realizando un experimento similar, pero detectando el antígeno T en lugar de p53. De esta manera, encontramos que, en las células que expresaban p53 y las construcciones que forman inclusiones nucleares, VP16- μ NS o VP16-GFP- μ NS o NLS- μ NS o NLS-GFP- μ NS o NLS-GFP- μ NS-Mi, el antígeno T se localiza exclusivamente en el núcleo sin coincidir con los cuerpos de inclusión (Figura 51A y 51B, paneles de arriba y resultados no mostrados), lo que demuestra que: i) el antígeno T no se asocia con los cuerpos de inclusión nucleares; y ii) el anticuerpo específico contra el antígeno T no reconoce a las inclusiones nucleares. En cambio, al sustituir p53 por p53-Intercoil, el antígeno T pasaba a localizarse mayoritariamente en las inclusiones (Figura 51A y 51B, paneles de abajo y resultados no mostrados). Estos resultados demuestran que: i) la incorporación del antígeno T a los cuerpos de inclusión nucleares por asociación con p53 no afecta a la integridad de los mismos; y ii) los sistemas aquí descritos pueden utilizarse como plataformas para ver si dos proteínas nucleares interaccionan entre sí en el núcleo de células eucariotas.

(A)



(B)

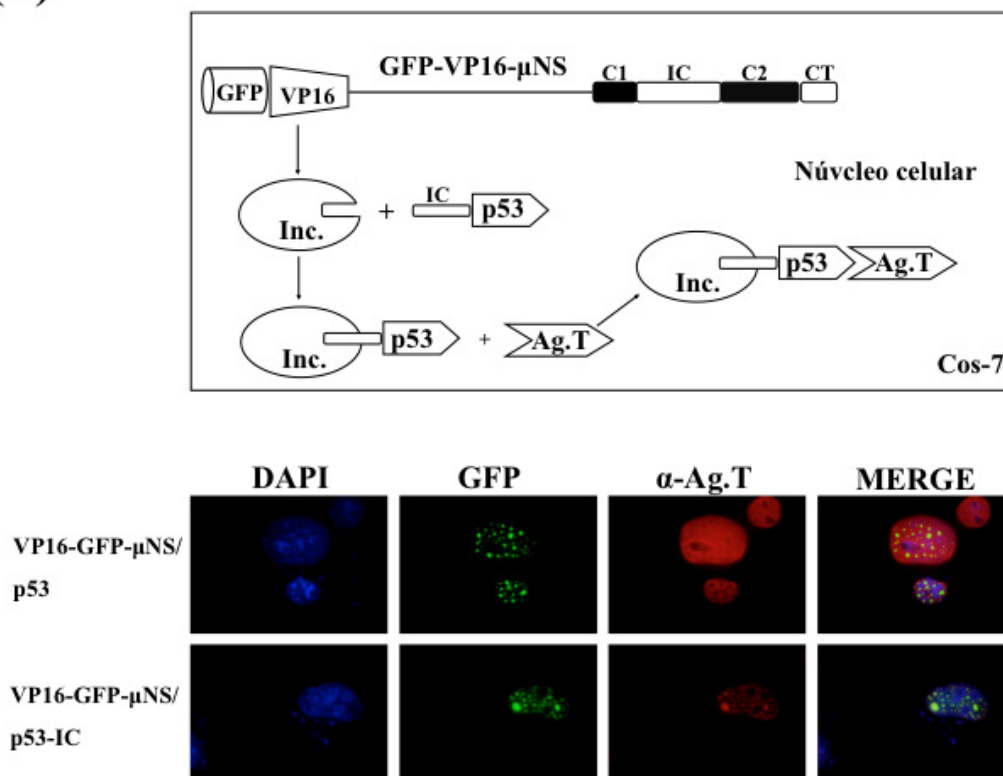


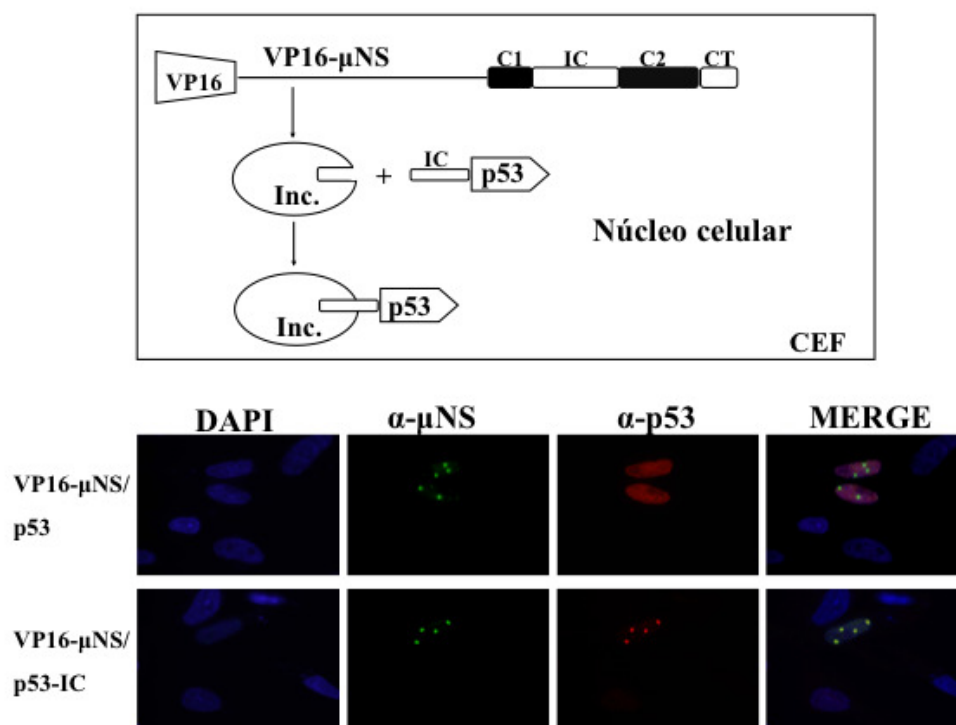
Figura 51. Distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de VP16-μNS o VP16-GFP-μNS co-expresadas con p53 o p53-Intercoil en células Cos-7. A-Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan VP16-μNS y p53 o VP16-μNS y p53-Intercoil. Células Cos-7 semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra el antígeno T (rojo) y contra μNS (verde). Los núcleos se

tiñeron de azul con DAPI. B- Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan VP16-GFP- μ NS y p53 o VP16-GFP- μ NS y p53-Intercoil. Igual que en A, pero en este caso la VP16-GFP- μ NS se visualizó directamente (verde). Encima de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia.

ii) Ag.T expresado con plásmidos en células CEF

Se obtuvieron los mismos datos al estudiar la interacción de p53 y el antígeno T en células CEF que expresan el antígeno T de forma transitoria, lo que puede observarse en los resultados que se muestran en las figuras 52 y 53 usando como ejemplos representativos la VP16- μ NS y GFP-VP16- μ NS.

(A)



(B)

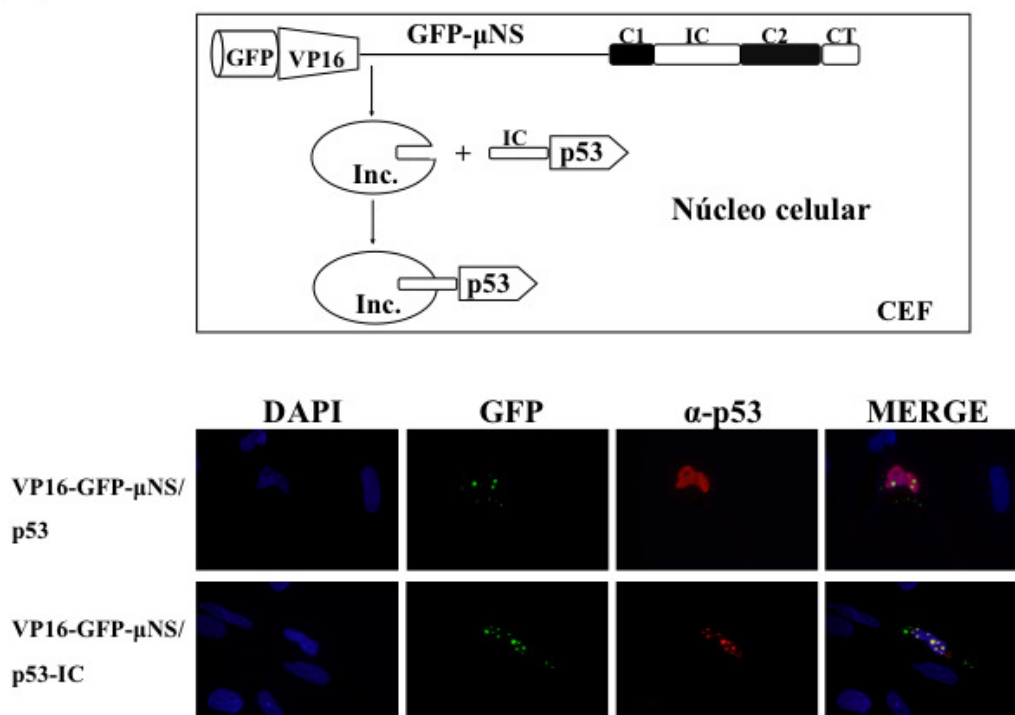
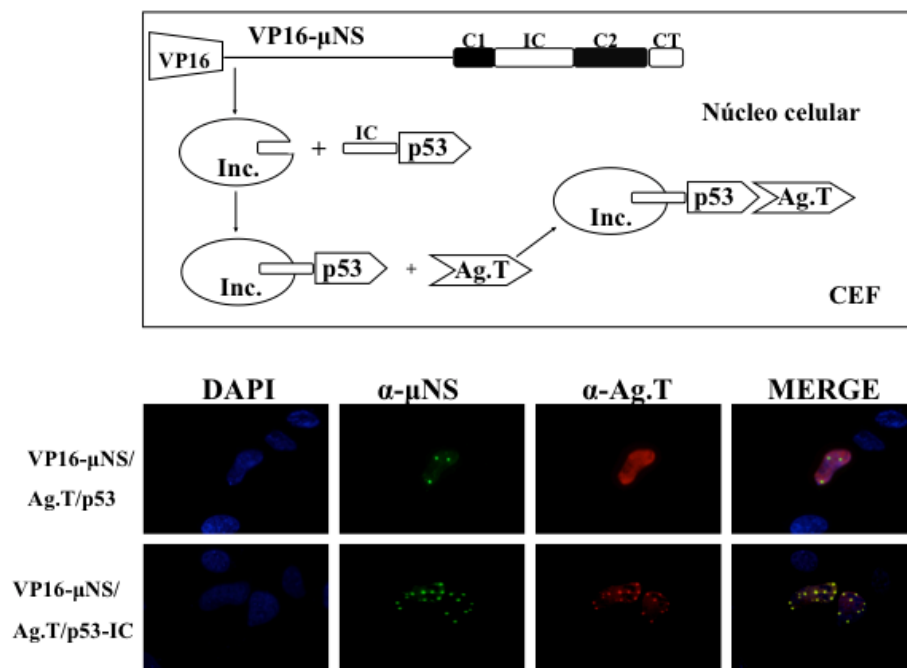


Figura 52. Distribución intracelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de las inclusiones nucleares que forman VP16-μNS y VP16-GFP-μNS en células CEF. A- Localización subcelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de las inclusiones que forma VP16-μNS. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra p53 (rojo) y contra μNS (verde). Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI.

B- Localización subcelular de p53 y p53-Intercoil en presencia de inclusiones que forma VP16-GFP- μ NS. Igual que en A, pero en este caso la VP16-GFP- μ NS se visualizó directamente (verde). Encima de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia.

(A)



(B)

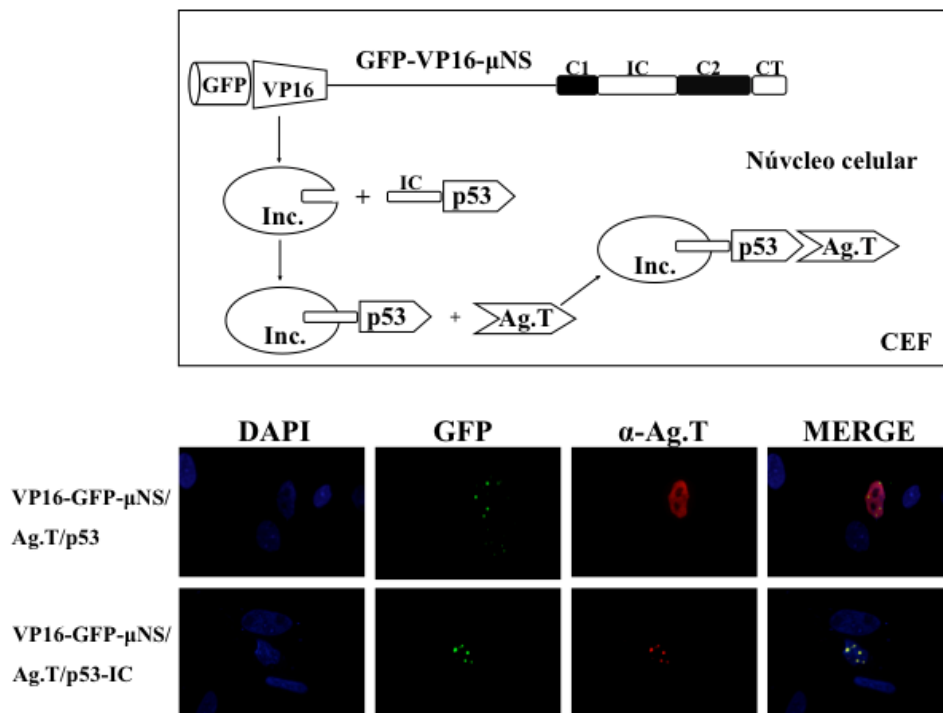


Figura 53. Distribución intracelular del antígeno T del SV40 en presencia de VP16- μ NS o VP16-GFP- μ NS co-expresadas con p53 y p53-Intercoil en células CEF. A- Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan VP16- μ NS y p53 o VP16- μ NS y p53-Intercoil. Células CEF

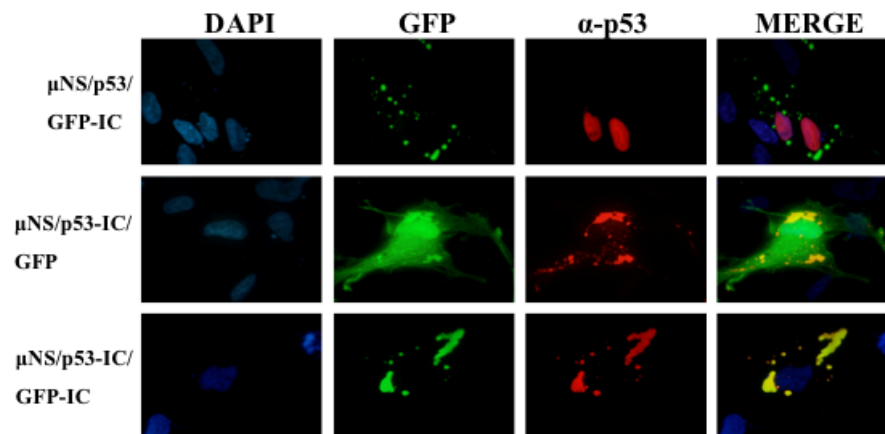
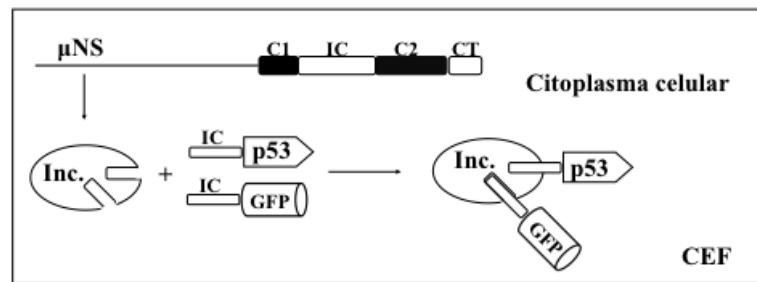
semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos contra el antígeno T (rojo) y contra μ NS (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). B- Localización subcelular del antígeno T en células que co-expresan VP16-GFP- μ NS y p53 o VP16-GFP- μ NS y p53-Intercoil. Igual que en A, pero en este caso la VP16-GFP- μ NS se visualizó directamente (verde). Encima de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia.

8. LA PROTEÍNA μ NS Y μ NS-Mi RECLUTAN SIMULTÁNEAMENTE A P53-INTERCOIL Y GFP-INTERCOIL

Otra de las posibles aplicaciones potenciales de nuestro sistema es el de favorecer el ensamblaje de complejos supramoleculares en el interior de las células, lo que facilitaría la caracterización estructural del complejo. Muchos complejos funcionales formados por la asociación de diferentes proteínas son difíciles de obtener mediante los sistemas clásicos de expresión de proteínas, probablemente debido a que la dispersión de sus componentes individuales en la célula dificulta su formación. Así, los viriones de reovirus son complejos supramoleculares que se ensamblan de una manera extremadamente eficiente en la célula infectada, probablemente porque la eficiencia de su formación está potenciada por el reclutamiento de los componentes de los viriones a las factorías virales, de una manera ordenada y selectiva (Tourís-Otero *et al.*, 2004b). De esta forma, al concentrarse dichos componentes en un mismo compartimiento, aumentan las posibilidades de interaccionar con los ligandos adecuados. Para poder desarrollar esta posible aplicación, lo primero que hicimos fue determinar si las inclusiones formadas por μ NS o μ NS-Mi son capaces de incorporar simultáneamente a varias proteínas etiquetadas con el dominio Intercoil. Para ello, elegimos las proteínas GFP y p53, porque disponíamos de sus genes clonados y porque sabíamos que se incorporan eficientemente a las inclusiones cuando están fusionadas al Intercoil. Posteriormente, co-transfectamos células CEF con cada una de las construcciones formadoras de inclusiones junto con: i) GFP-Intercoil (GFP-IC) y p53-Intercoil (p53-IC); ii) GFP y p53-Intercoil (que sirve de control, para determinar que GFP sin Intercoil no se incorpora a las inclusiones por asociación con p53); y iii) GFP-Intercoil y p53 sin etiquetar (que sirve de control, para demostrar que p53 sin Intercoil no se incorpora a las inclusiones por asociación con GFP). Las células se fijaron a la 18 h.p.t. y se sometieron a inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal contra p53. Las proteínas GFP-

Intercoil y p53-Intercoil se localizaban exclusivamente en las inclusiones formadas tanto por μ NS (Figura 54A, paneles de abajo), como por μ NS-Mi (Figura 54B, paneles de abajo). Además, en las células que co-expresan μ NS o μ NS-Mi junto con GFP-Intercoil y p53, la GFP-Intercoil se localizaba en las inclusiones mientras que p53 permanecía en el núcleo (Figura 54A y 54B, paneles de arriba), y en las que co-expresan μ NS o μ NS-Mi junto con GFP y p53-Intercoil, la p53-Intercoil se localizaba en los cuerpos de inclusión mientras que GFP se distribuía por toda la célula sin incorporarse eficientemente a las inclusiones (Figura 54A y 54B, paneles del medio), lo que demuestra que p53 y GFP se incorporan a las inclusiones debido a su etiquetado con el Intercoil y no por asociación entre ambas. Estos resultados demuestran que las inclusiones formadas por μ NS y μ NS-Mi son capaces de capturar simultáneamente varias proteínas etiquetadas con el dominio Intercoil, sin alterar la integridad de las inclusiones ni a la actividad de la proteína incorporada, ya que GFP continuaba emitiendo su fluorescencia característica.

(A)



(B)

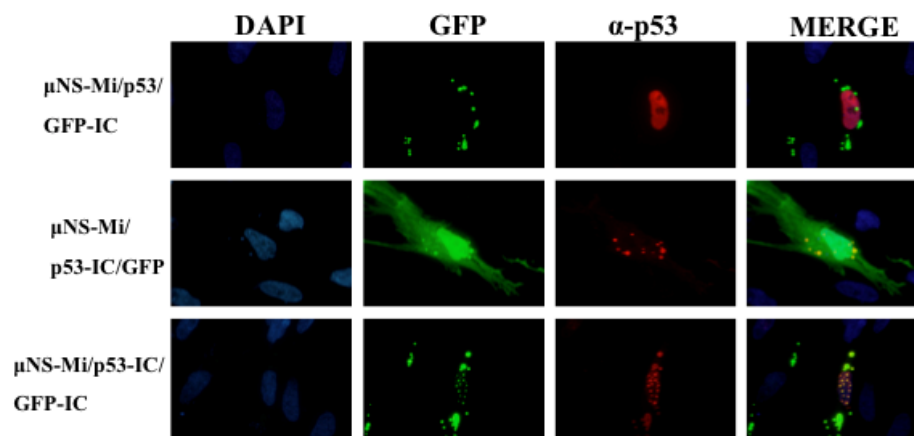
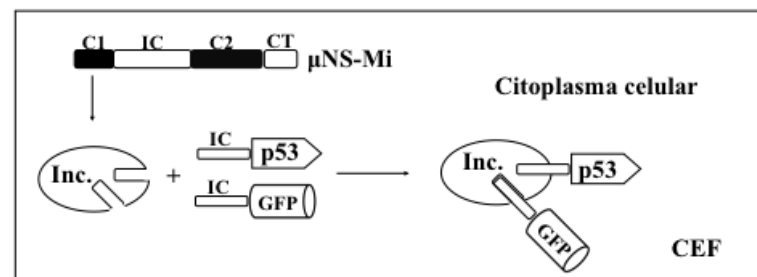


Figura 54. Distribución intracelular de p53-Intercoil y GFP-Intercoil en presencia de las inclusiones que forman μNS y μNS-Mi. A- Localización subcelular de p53-Intercoil y GFP-Intercoil en presencia

de las inclusiones que forma μ NS. Células CEF semiconfluentes se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. Las células se fijaron a las 18 h.p.t. y posteriormente se sometieron a inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra p53 (rojo), la GFP-Intercoil y GFP se visualizaron directamente (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). B- Localización subcelular de p53-Intercoil y GFP-Intercoil en presencia de las inclusiones que forma μ NS-Mi. Lo mismo que en A. Encima de los paneles se representa un esquema de lo que se muestra en las imágenes de inmunofluorescencia.

V. DISCUSIÓN

1. RELACIÓN ENTRE LAS FACTORÍAS VIRALES DEL REOVIRUS AVIAR Y LAS INCLUSIONES FORMADAS POR LA PROTEÍNA μ NS Y LOS AGRESOMAS

Como se comentaba en la introducción, la replicación y ensamblaje de los miembros de la familia *Reoviridae* se lleva a cabo en unas estructuras citoplasmáticas carentes de membrana y densas al microscopio electrónico denominadas viroplasmas, factorías virales o cuerpos de inclusión viral (Estes., 2001; Roy., 2001; Nibert y Schiff., 2001). Se ha demostrado que la formación de viroplasmas corre a cargo de proteínas no estructurales específicas, como la μ NS de reovirus de mamífero, la NSP5 de rotavirus y la NS2 de bluetongue virus (Broering *et al.*, 2002; Mohan *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 1990). Numerosas observaciones sugieren que en el caso del género Orthoreovirus la proteína no estructural μ NS es el factor mínimo necesario para formar las factorías virales, ya que es la única proteína capaz de formar inclusiones citoplasmáticas cuando se expresa de forma individual (Touris-Otero *et al.*, 2004a; Broering *et al.*, 2002). En el caso de rotavirus las factorías virales de células infectadas están constituidas por dos proteínas no estructurales: NSP2 (antes NS35) y NSP5 (antes NS26) (Fabbretti *et al.*, 1999). NSP2, como σ NS en reovirus, une RNA y forma complejos ribonucleoproteicos en células infectadas (Kattoura *et al.*, 1992; Patton *et al.*, 1993; Kattoura *et al.*, 1994). Resultados experimentales sugieren que NSP5 es la proteína responsable de formar las factorías virales de rotavirus y que NSP2 actúa como un cofactor que se une al extremo amino de NSP5 y lo bloquea, permitiendo así que NSP5 se fosforile y forme inclusiones (Poncet *et al.*, 1997). El bloqueo de este extremo con cualquier otra proteína, como la GFP, se ha demostrado igualmente eficaz en este sentido (Mohan *et al.*, 2003). El extremo carboxilo de NSP5 está fuertemente conservado y posee una muy elevada probabilidad de tener una estructura de α -hélice. Precisamente, este extremo carboxilo de NSP5 es el responsable de su multimerización y, en último lugar, de la formación del viroplasma (Torres-Vega *et al.*, 2000; Mohan *et al.*, 2003).

Por otro lado, en el caso del virus bluetongue, otro de los miembros de la familia *Reoviridae* que está bien caracterizado, las inclusiones virales son creadas por la proteína no estructural NS2 (Thomas *et al.*, 1990), y recientemente se ha demostrado que la expresión individual de esta proteína origina cuerpos de inclusión con una morfología

similar al de los viroplasmos formados durante la infección (Kar *et al.*, 2007). Al igual que la proteína NSP2 de rotavirus, NS2 se une a ssRNA formando complejos ribonucleoproteicos en células infectadas (Huisman *et al.*, 1987; Thomas *et al.*, 1990; Horscroft y Roy, 2000; Taraporewala *et al.*, 2001), y también se ha publicado que NS2 se une de forma específica al mRNA viral (Lymperopoulos *et al.*, 2003). Aunque en nuestro laboratorio no hemos podido detectar que la μ NS del reovirus aviar tenga afinidad por ácidos nucleicos, mediante diferentes ensayos realizados *in vitro*, se ha publicado que la proteína μ NS del reovirus de mamífero está asociada a mRNAs virales en células infectadas, y parece que esta proteína es la primera proteína viral que se une a los mRNAs reovirales una vez sintetizados (Antczak y Joklik, 1992).

Como hemos comentado en la introducción, numerosos virus utilizan la formación de agresomas o autofagosomas para construir sus factorías virales. Dado que al empezar este trabajo se desconocía por completo la posible relación de las factorías virales y de los cuerpos inclusión formados por μ NS con estas estructuras, iniciamos la caracterización de esta proteína abordando este aspecto. Los resultados obtenidos demuestran que la formación de las factorías virales y de las inclusiones formadas por la proteína μ NS del reovirus aviar no están relacionadas con los mecanismos de generación de agresomas o autofagosomas, ya que las inclusiones virales no están rodeadas por jaulas de vimentina ni están posicionadas en el MTOC. También hemos demostrado que ni las factorías virales ni las inclusiones derivadas de μ NS están poliubiquitinadas, sugiriendo que no se trata de agregados de proteínas marcadas para ser degradados por el proteasoma. Además, a diferencia de lo que ocurre con las factorías virales filamentosas de muchos reovirus de mamífero, las factorías de los reovirus aviares son globulares y no están asociadas a los microtúbulos.

La mayoría de las cepas de reovirus de mamífero forman factorías filamentosas, y solamente la cepa T3D^N produce factorías globulares (Parker *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el fenotipo filamentoso de las factorías de reovirus de mamífero radica en la proteína estructural minoritaria del core μ 2, y se debe a su capacidad para asociarse a los microtúbulos y a la proteína μ NS (Parker *et al.*, 2002; Broering *et al.*, 2002). La formación de las factorías de reovirus de mamífero en células infectadas, independientemente de si son globulares o filamentosas, es dependiente de los microtúbulos, ya que el tratamiento con nocodazol evita que las inclusiones iniciales

pequeñas de μ NS se fusionen para dar lugar a las inclusiones perinucleares grandes que se observan a tiempos tardíos de infección (Parker *et al.*, 2002). Un efecto similar se observó con las inclusiones globulares formadas por μ NS de reovirus de mamífero en células transfectadas (Broering *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que, al igual que ocurre con la formación de agresomas, se requiere un transporte retrógrado a través de los microtúbulos para que las inclusiones pequeñas converjan en inclusiones perinucleares grandes cerca del MTOC (Broering *et al.*, 2002). En este trabajo hemos observado que el tamaño de los viroplasmás del reovirus aviar y de las inclusiones que forma μ NS también aumenta a lo largo de la infección/transfección, lo que sugiere que las inclusiones pequeñas se fusionan para formar otras más grandes. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que ni las factorías del reovirus aviar ni las inclusiones derivadas de μ NS están asociadas a los microtúbulos celulares, y que tampoco se requiere un transporte retrógrado a través de los microtúbulos para la maduración de estas estructuras, a diferencia de lo que ocurre con las factorías de reovirus de mamífero. Por lo tanto, a pesar de que las proteínas μ NS de reovirus de mamífero y aviar presentan una actividad similar, se diferencian en: i) su tamaño (721 aminoácidos de la de mamífero frente a los 635 de la aviar); ii) su capacidad de reclutamiento de proteínas virales (Becker *et al.*, 2001; Broering *et al.*, 2002, 2004; Miller *et al.*, 2003; Touris-Otero *et al.*, 2004a, 2004b); y iii) la forma en que se construyen y evolucionan sus cuerpos de inclusión citoplasmáticos (Parker *et al.*, 2002; Broering *et al.*, 2004).

2. CARACTERIZACIÓN DEL ESTATUS OLIGOMÉRICO DE LA PROTEÍNA μ NS

Resultados anteriores de nuestro laboratorio sugerían que la proteína μ NS es el factor viral mínimo necesario para formar viroplasmás en células infectadas con reovirus aviar, sin embargo, en esos estudios no se había examinado la naturaleza oligomérica de la proteína. Mediante el uso del sistema del doble híbrido adaptado a células de mamífero (Clontech, Saint Germain en Laye, Francia), en este trabajo demostramos que los monómeros de μ NS interactúan fuertemente entre sí en el interior de la célula, para formar al menos dímeros. Esta capacidad de auto-interacción debería ser esencial para una proteína que es capaz de construir inclusiones citoplasmáticas tridimensionales en el interior de las células. Sin embargo, quedaba por

esclarecer si el almacén de las inclusiones que forma μ NS estaba constituido únicamente por esta proteína o si también contenía proteínas celulares. Para comprobarlo, desarrollamos un protocolo sencillo para la purificación de las inclusiones que forma μ NS en células de insecto y, a continuación, examinamos la composición proteica de las estructuras purificadas. En primer lugar, comprobamos por inmunofluorescencia que la proteína formaba inclusiones en células de insecto infectadas con el baculovirus recombinante de μ NS. De esta forma, demostramos que la capacidad de μ NS para formar inclusiones es independiente de factores específicos de tipo celular, ya que es capaz de formar inclusiones cuando se expresa en células de insecto, de mamífero o aviares, y por diferentes sistemas (infección con reovirus aviar o con baculovirus recombinante y transfección con plásmidos de expresión). El análisis electroforético de los cuerpos de inclusión purificados reveló que las inclusiones están formadas fundamentalmente por μ NS, pues a pesar de que en el gel se observan pequeñas trazas de proteínas contaminantes, la mayoría de ellas son fragmentos proteolíticos de μ NS. Sin embargo, hay que reconocer que la tinción de las bandas proteicas con azul de Coomassie no es lo suficientemente sensible como para descartar la posibilidad de que proteínas celulares, péptidos pequeños, u otras moléculas formen parte de las inclusiones, aunque de ser así, estarían en proporciones mucho más pequeñas que μ NS.

Una ventaja de disponer de un protocolo para purificar las inclusiones de μ NS es que permitirá estudiar sus características *in vitro*, para determinar el modo en que los monómeros de μ NS interactúan entre ellos y la posible implicación de chaperonas moleculares u otras proteínas en la construcción de estas estructuras multiméricas. La dificultad que presenta el cristalizar proteínas como la μ NS es evidente, debido a su gran insolubilidad y tendencia a la agregación. Sin embargo, se podrían aplicar métodos experimentales, previamente usados con éxito en el estudio de estructuras complejas formadas por agregados de proteínas (fibras amiloides), para obtener información sobre la estructura espacial de las inclusiones y su mecanismo de formación, tales como microscopía electrónica, microscopía de fuerza atómica, difracción en fibra, intercambio hidrógeno-deuterio y resonancia magnética nuclear en estado sólido (Nilsson 2004; Jack *et al.*, 2006; Sachse *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008). Además, las inclusiones purificadas se podrían dismantelar y reconstruir para estudiar las interacciones mediadas por los monómeros de μ NS, y a las inclusiones dismanteladas se les podrían añadir factores

virales para evaluar si se incorporan a esas estructuras y si se requiere un determinado orden de incorporación. Dado que en la región Intercoil se detectaron dos residuos imprescindibles para formar inclusiones y con un alto potencial para quelar metales, se podría analizar la posible presencia de iones metálicos en las inclusiones por espectroscopia de absorción atómica, para así determinar si la quelación de metales es necesaria para que μ NS forme inclusiones. Por otra parte, hemos intentado adaptar el protocolo de purificación de las inclusiones de células de insecto para tratar de purificar las factorías virales de células infectadas con el reovirus aviar, pero no obtuvimos resultados satisfactorios, ya que las factorías virales parecen ser menos densas y más débiles que las inclusiones que forma μ NS. Esto apoya la idea de que las inclusiones de μ NS y las factorías reovirales son estructuralmente y funcionalmente diferentes, ya que estas últimas probablemente contengan, además de μ NS, otras proteínas virales, ARN viral, y quizás factores celulares.

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS DE μ NS IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DE INCLUSIONES

Si μ NS es capaz de construir inclusiones por sí misma, es de esperar que posea varios dominios de auto-interacción diferentes. Unos dominios serían utilizados por los monómeros para auto-asociarse y formar oligómeros basales, pero deberían quedar dominios adicionales libres y accesibles para que los oligómeros basales pudiesen interaccionar con otros oligómeros o monómeros de μ NS, y así crecer en las tres dimensiones hasta formar inclusiones. Para identificar esos dominios hemos analizado la capacidad formadora de inclusiones de mutantes de delección N-terminal y C-terminal de μ NS en células transfectadas. De los resultados obtenidos extrajimos las siguientes conclusiones: i) los primeros 447 aminoácidos no son necesarios para formar inclusiones; ii) residuos del extremo C-terminal de μ NS son imprescindibles para la formación de inclusiones; iii) la región que comprende los residuos 155-380 controla la morfología y el tamaño de las inclusiones; y iv) la fracción mínima de μ NS con capacidad para formar inclusiones (μ NS-Mi) abarca los aminoácidos 448 a 635 (187 residuos). Al igual que la región mínima de la μ NS del reovirus de mamífero, μ NS-Mi, contiene dos dominios “coiled-coil” (**Coil 1** o **C1** y **Coil2** o **C2**); una región que une los dos “coiled-coil” (**Intercoil** o **IC**); y finalmente una región de 30 aminoácidos que sigue

al segundo “coiled-coil” (denominado **C-Tail** o **CT**). A pesar de que la región mínima de las μ NS de reovirus aviar y de mamífero poseen una organización modular similar, el extremo amino de la μ NS-Mi de reovirus de mamífero contiene un segmento extra de aproximadamente 50 residuos anterior al Coil 1 (Broering *et al.*, 2005), que no está presente en la μ NS-Mi del reovirus aviar. Por tanto, parece que debe haber secuencias dentro de ese segmento que son necesarias para la actividad de la μ NS de reovirus de mamífero, pero no para la del aviar.

Nuestros resultados también sugieren que secuencias dentro de la región 155-380 de la μ NS del reovirus aviar controlan el tamaño y morfología de las inclusiones. Esta observación está apoyada por el hecho de que la expresión de μ NS entera en células de insecto forma inclusiones muy grandes que ocupan la mayor parte del citosol, mientras que se forman inclusiones redondeadas más pequeñas y numerosas cuando se expresan mutantes de μ NS que carecen de esa región, como μ NS-Mi y CA-C- μ NS(448-605). Aunque no se ha identificado un dominio equivalente en la μ NS de reovirus mamífero, su región 41-172 parece que controla la morfología de las inclusiones, ya que su delección genera inclusiones más alargadas y huecas, aunque no más pequeñas (Broering *et al.* 2005). Es probable que el tamaño de las inclusiones que forma la μ NS del reovirus de mamífero no esté controlado por un dominio de auto-interacción, sino que resida en la capacidad de esta proteína para interaccionar con proteínas citoesqueléticas y viajar a través de los microtúbulos hacia el MTOC. Esta hipótesis estaría apoyada por la observación de que el tratamiento con nocodazol previene la formación de inclusiones grandes por parte de la μ NS de reovirus de mamífero pero no por parte de su homóloga aviar.

El hecho de que el Coil1 de la proteína μ NS del reovirus de mamífero pueda ser sustituido por una proteína dimérica como GFP, pero no por el epitopo monomérico HA hizo suponer a los autores de ese estudio que el Coil1 desempeña una función de “auto-asociación” para permitir la formación de los oligómeros basales que participan en la formación de inclusiones (Broering *et al.*, 2005), pero sin embargo esta hipótesis no se ha comprobado experimentalmente. Al igual que con esta proteína, GFP también es capaz de sustituir al Coil1 de la μ NS del reovirus aviar. Para confirmar experimentalmente que la dimerización de GFP es la responsable de restaurar el fenotipo formador de inclusiones, el Coil1 de la μ NS-Mi del reovirus aviar se sustituyó

por CA-C y CA-C-M. Como en el caso de GFP, la sustitución del Coi11 por CA-C originó inclusiones globulares, mientras que la quimera que se originó al sustituirlo por el dominio de dimerización mutado CA-C-M se distribuía de forma difusa por toda la célula, aunque también se observó la presencia de pequeñas inclusiones dispersas por todo el citoplasma. Estos resultados demuestran que el Coi11 puede ser sustituido por un dominio dimérico, lo que a su vez sugiere que la capacidad de auto-asociación de este dominio juega un papel importante en la generación de oligómeros basales.

Cuando se sustituyó la región C-tail por los dominios de dimerización indicados arriba, obtuvimos resultados novedosos e interesantes, de los que extrajimos las siguientes conclusiones: i) secuencias dentro de la región C-tail son imprescindibles para formar inclusiones; ii) el dominio C-tail de μ NS y μ NS-Mi puede ser sustituido por dominios diméricos; iii) el dominio de dimerización GFP puede rescatar el fenotipo de la versión de μ NS al que se le eliminó la región C-tail cuando se fusiona a cualquiera de sus dos extremos; iv) se forman inclusiones tubulares cuando GFP sustituye al dominio C-tail de μ NS-Mi; v) se generan inclusiones con morfología globular cuando GFP sustituye al C-tail de la μ NS entera, cuando CA-C sustituye al C-tail en μ NS-Mi, y cuando la C-tail se añade a la construcción que forma inclusiones tubulares, para generar GFP- μ NS-Mi. Teniendo en cuenta estos resultados concluimos que, al igual que el Coi11, el C-tail participa en la interacción entre monómeros para formar oligómeros basales. Además, nuestro descubrimiento de que se forman inclusiones tubulares cuando la región C-tail es reemplazada por GFP (dímero con monómeros antiparalelos), y que se forman inclusiones globulares cuando es sustituida por CA-C (dímero con monómeros paralelos en forma de V), sugiere que cuando el C-tail está ausente, la morfología de las inclusiones depende del dominio dimérico que lo sustituye. Esto sugiere que la región C-tail orienta aquellos contactos iniciales entre monómeros de μ NS que son esenciales para la generación de oligómeros basales y que controlan la forma de las inclusiones y la eficiencia de su formación. Esta sugerencia está apoyada por el hecho de que al añadir la región C-tail a la construcción que forma inclusiones tubulares se rescata el fenotipo globular, lo que confirma que la C-tail está directamente implicada y es dominante sobre GFP en la orientación de los contactos entre monómeros de μ NS. Probablemente la ausencia del dominio C-tail da lugar a la formación de oligómeros que interaccionan entre sí de manera desordenada y al azar, lo cual posiblemente bloquee y/o oculte los dominios de interacción necesarios para que

los oligómeros basales progresen hacia inclusiones grandes. Esta hipótesis está fuertemente apoyada por los resultados mostrados en la figura 25, en donde se demuestra que la pérdida de función causada por la delección de la región C-tail de μ NS es recuperada mediante la adición de GFP, tanto al extremo amino como al carboxilo. Así pues, GFP probablemente actúe guiando los contactos entre los monómeros de μ NS para originar oligómeros basales.

Nuestro descubrimiento de que las regiones C-tail y Coil1 de μ NS-Mi pueden ser sustituidos por dominios de dimerización podría ser usado como un sistema para la identificación de proteínas y dominios oligoméricos, ya que su fusión a las regiones μ NS(448-605) y μ NS(477-635) probablemente daría lugar a la formación de inclusiones, mientras que la fusión de dominios o proteínas monoméricas originaría quimeras que se distribuirían de forma difusa por toda la célula. Actualmente estamos investigando si este sistema podría tener una aplicación general para la detección de proteínas y dominios con capacidad de oligomerización en el interior de células vivas, y si este sistema permitiría identificar la orientación de los monómeros en proteínas diméricas.

Teniendo en cuenta la forma inusual de las inclusiones tubulares y la presencia de los epitopos exógenos CA-C y GFP en esas construcciones, existe la posibilidad de que las inclusiones formadas por esas quimeras contuviesen proteínas celulares, y que esas proteínas pudiesen enmascarar la verdadera implicación de GFP, CA-C y los dominios individuales de μ NS-Mi, en la construcción y orientación de las inclusiones. Para resolver esta cuestión, purificamos las inclusiones generadas por las quimeras GFP- μ NS(448-605) y CA-C- μ NS(448-605) en células de insecto, y el análisis de sus contenidos proteicos reveló que el principal componente de las inclusiones purificadas eran las proteínas quiméricas, confirmando nuestras anteriores observaciones con respecto al papel del C-tail. Por otra parte, la observación de los tubos purificados con un microscopio electrónico de barrido reveló que se trata de estructuras cilíndricas que no parecen estar huecas (Figura 55). Además, su grosor aumenta con el nivel de expresión de la proteína, y son más grandes cuando la proteína se expresa en células de insecto que en células CEF transfectadas. Todo esto sugiere que el tamaño de los tubos depende de la concentración intracelular de la proteína que los forma, y también sugiere que los tubos pequeños se asocian lateral y linealmente para formar tubos más grandes.

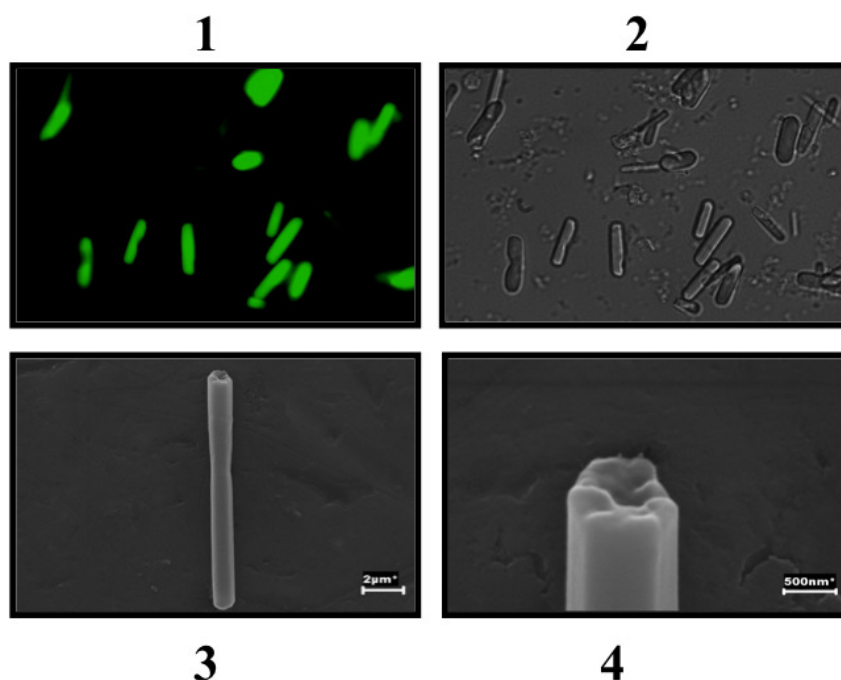


Figura 55. Visualización de las inclusiones tubulares (GFP-C1-IC-C) por microscopía electrónica de barrido. Las inclusiones tubulares se purificaron a partir de células Sf9 infectadas con un baculovirus recombinante que expresa GFP- μ NS(448-605), tal y como se indica en el pie de la figura 24 (ver Materiales y Métodos). Los tubos purificados se visualizaron con un microscopio de fluorescencia (1), óptico (2), o electrónico (3 y 4). En el panel 4 se muestra una imagen ampliada del panel 3.

En este trabajo también encontramos evidencias de que el Coil 2 de μ NS contiene secuencias necesarias para la formación de inclusiones, ya que la construcción GFP- μ NS(448-605), la cual carece de la región C-tail, forma inclusiones, mientras que GFP- μ NS(448-542), en la cual no están presentes ni el C-tail ni el Coil 2, no. Sin embargo, se requerirán más estudios para descubrir el papel exacto del Coil 2 en la formación de inclusiones. Por otra parte, encontramos que el Coil 2 se incorpora a las inclusiones de μ NS o μ NS-Mi, demostrándose que probablemente se trate de un dominio implicado en la interacción entre los monómeros de la proteína.

Un estudio realizado con la proteína μ NS del reovirus de mamífero había revelado que dos residuos altamente conservados de su región Intercoil, la histidina 570 y la cisteína 572, son imprescindibles para formar inclusiones, ya que su mutación individual causa la pérdida del fenotipo (Broering *et al.*, 2005). Dado que los residuos de cisteína e histidina tienen un alto potencial para quelar iones metálicos divalentes como el Zn^{+2} y que otros residuos cercanos dentro de la misma región con similar potencial para quelar metales no son necesarios para formar inclusiones, los autores

sugirieron que la histidina 570 y la cisteína 572 podrían representar la mitad de un motivo intermolecular de quelación de iones divalentes, y que el motivo completo se podría formar por homo-dimerización de dos monómeros de μ NS o por hetero-dimerización de un monómero de μ NS con otra proteína, tal como ocurre con otras proteínas. Así, se ha publicado que se genera un motivo intermolecular de quelación por homodimerización en el complejo Rad50 (Hopfner *et al.*, 2002) y por hetero-dimerización de las proteínas CD4/8 y LcK (Huse *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003). Los resultados de este estudio también demostraron que residuos equivalentes de la proteína μ NS del reovirus aviar, la histidina 487 y la cisteína 489, son imprescindibles para formar inclusiones. Sin embargo, el hecho de que μ NS sea el componente mayoritario, sino el único, de las inclusiones que forma esta proteína sugiere que no se forma un motivo de quelación de iones divalentes por heterodimerización de μ NS con otra proteína. Por otra parte, tampoco parece que el motivo de quelación se pueda formar por interacción de la región Intercoil consigo misma, ya que cuando se co-transfectan células con los plásmidos que expresan las quimeras que contienen la región Intercoil, GFP-C1-IC-C2 o CA-C-C1-IC-C2, junto con p53-Intercoil, esta última no se asocia a las inclusiones que forman GFP-C1-IC-C2 o CA-C-C1-IC-C2 (datos no mostrados), lo que sugiere que el Intercoil no interacciona consigo mismo, o que si interacciona requiere de algún dominio adicional. Una posibilidad es que el motivo de quelación se forme al interaccionar el Intercoil con otra región diferente de μ NS. Otra posibilidad es que la histidina y la cisteína conservadas no formen parte de un dominio de quelación, sino que actúen como confórmers de plegamiento local, estructurando una región de aminoácidos de una manera precisa para favorecer el plegamiento y actividad correcta de la proteína, sin necesidad de tener que encontrar una pareja similar en un monómero diferente. En cualquier caso, se necesitarán experimentos adicionales para clarificar esta cuestión.

Las inclusiones formadas por la proteína μ NS son grandes y complejos ensamblados proteicos que podrían ser vistos por las células como agregados de proteínas. Los agregados de proteínas se definen como complejos oligoméricos de confórmers no nativos que surgen de interacciones entre intermediarios estructurados durante el plegamiento de la proteína (Wetzel, 1994; Kopito, 2000). Estos se pueden dividir en dos categorías: i) amorfos, agregados inespecíficos que están poliubiquitinados y que inducen la formación de agrosomas o autofagosomas, y ii)

estructurados, donde la agregación surge de interacciones específicas entre monómeros que resulta en la formación de una estructura final ordenada. La proteína μ NS y la mayoría de sus mutantes con capacidad para formar inclusiones producen cuerpos de inclusión citoplasmáticos con forma regular, que no están poliubiquitinados ni rodeados por jaulas de vimentina, lo que sugiere que las inclusiones que forma μ NS son agregados de proteínas estructurados que de alguna manera escapan a los mecanismos celulares de defensa contra la agregación de proteínas. La disponibilidad de mutantes de μ NS que forman agregados amorfos ubiquitinados sugiere que esta proteína viral podría ser utilizada como modelo para estudiar los mecanismos que la célula usa para detectar y luchar contra la agregación de proteínas. Este trabajo representa un primer paso para entender los eventos moleculares que permiten a μ NS construir de forma eficiente cuerpos de inclusión citoplasmáticos estructurados, y los resultados obtenidos tienen gran interés, tanto en el campo de los reovirus, como en otros escenarios celulares donde la agregación de proteínas (estructurada o no) constituye un fenómeno fundamental para muchas patologías neurológicas.

4. DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA PURIFICAR PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE INSECTO Y PARA DETECTAR ASOCIACIONES DE PROTEÍNAS BASADOS EN SU RECLUTAMIENTO A LAS INCLUSIONES FORMADAS POR LAS PROTEÍNAS μ NS Y μ NS-Mi

En la segunda parte de la tesis, hemos analizado la capacidad de diferentes dominios de μ NS para asociarse con las inclusiones que forma esta proteína. Con la metodología empleada obtuvimos las siguientes conclusiones: i) con la sorprendente excepción del C-Tail, los demás dominios de μ NS-Mi interaccionan con μ NS; ii) al margen de μ NS-Mi existe una región (residuos 381-448) que, si bien no es esencial para la formación de inclusiones, interacciona con muy alta afinidad con μ NS, pero no con μ NS-Mi, lo que sugiere que esta región interacciona con secuencias del extremo amino de μ NS. Curiosamente, en la primera parte de este trabajo hemos identificado un dominio situado justo antes de esta región (residuos 155 a 380) implicado en determinar el tamaño y morfología de las inclusiones, por lo que no se debe descartar que esta región forme parte de dicho dominio, ya que la delección de los primeros 380 residuos

puede provocar que no se pliegue correctamente y ejerza su función; iii) las regiones o dominios que presentan una mayor afinidad/especificidad en la interacción con las inclusiones de μ NS son el dominio Intercoil y el (381-448). El que no hayamos podido detectar interacción del dominio C-Tail resulta llamativo, ya que en la primera parte de la tesis habíamos demostrado la implicación de este dominio en la orientación monómero-monómero que dicta la eficiencia de la formación de las inclusiones de μ NS. De todas formas, puede que la metodología empleada en este estudio no sea la correcta para investigar el papel del dominio C-Tail y/o que la ausencia del resto de la proteína impida su correcto plegamiento.

La alta afinidad que presentan algunos dominios individuales de μ NS por las inclusiones que forma μ NS nos inspiró la idea de crear un sistema para dirigir proteínas exógenas a estas estructuras. De esta manera simularíamos el sistema que los reovirus emplean para aumentar la eficiencia del proceso de morfogénesis: concentrar sus componentes en un compartimento citoplasmático carente de membrana y que se mantiene por contactos proteína-proteína. Al dirigir la proteína GFP a las inclusiones de μ NS y μ NS-Mi, etiquetándola con diferentes dominios de μ NS, obtuvimos resultados muy parecidos a los obtenidos con el epitopo HA, con la excepción de que el etiquetado con la región 381-448 no lograba llevar a GFP a las inclusiones, aunque sí lo hacía el etiquetado con el extremo N-terminal entero (1-448). Esto permite suponer que GFP bloquea la interacción de la región 381-448 por impedimento estérico, y que la presencia de secuencias adicionales en el extremo amino de esta región permite el rescate de la interacción. El dominio C-Tail tampoco producía incorporación y de nuevo el dominio que mejor funcionó fue el Intercoil, lo que nos hace pensar que el dominio Intercoil posee una cierta autonomía de plegamiento que lo hace funcionar de manera independiente. Por otra parte, los 2 dominios “coiled-coil” (Coil1 y Coil2) también produjeron reclutamiento, aunque con menor eficiencia que el Intercoil. De esta manera hemos demostrado que algunos dominios de μ NS pueden ser usados como “tags” o etiquetas moleculares para dirigir proteínas a las inclusiones formadas por μ NS, μ NS-Mi y sus derivados. Este sistema de “secuestro” o envío de proteínas a estos compartimentos puede tener numerosas aplicaciones potenciales, de las que destacamos:

1- Purificación de proteínas. En la primera parte de la tesis hemos demostrado que las inclusiones generadas por expresión de μ NS mediante el sistema de baculovirus en

células de insecto se purifican con mucha facilidad, por lo que si enviamos selectivamente una proteína a dichas inclusiones también se podría purificar. En este trabajo hemos comprobado el funcionamiento del sistema mediante la purificación de la proteína GFP etiquetada con el dominio Intercoil y utilizando las proteínas μ NS y μ NS-Mi como formadoras de inclusiones. En ambos casos hemos conseguido purificar GFP mediante un protocolo muy simple y barato, ya que se basa en la alta densidad y resistencia de las inclusiones citoplasmáticas de μ NS y derivados, que las hace fácilmente purificables por centrifugación. Además, la proteína GFP etiquetada y asociada a las inclusiones está correctamente plegada, ya que conserva su actividad fluorescente dentro de la inclusión.

2- Purificación de enzimas activas. También hemos demostrado que la luciferasa etiquetada con el Intercoil se purifica fácilmente cuando está asociada a las inclusiones. Además, la proteína conserva su actividad catalítica cuando está integrada en la inclusión y se separa fácilmente por centrifugación o por filtración a través de un filtro de 0,22 μ M. Uno de los pasos críticos en la obtención de productos catalizados por enzimas industriales es la eliminación de la enzima utilizada. Con nuestro sistema, las enzimas podrían utilizarse para catalizar la reacción cuando están integrados en las inclusiones purificadas, y se eliminarían fácilmente al acabar la reacción mediante una simple centrifugación o filtración. Para otro tipo de aplicaciones, en las que es necesario obtener una proteína pura en disolución, la proteína podría liberarse fácilmente de las inclusiones por incubación en presencia de sal, y así obtenerse purificadas en solución sin presentar ningún vestigio de μ NS o μ NS-Mi, tal como hemos demostrado que ocurre con GFP-Intercoil. Nuestro sistema representa una plataforma novedosa, versátil y barata de purificación de proteínas basada en la interacción del dominio Intercoil con las inclusiones citoplasmáticas generadas por μ NS y sus derivados.

3- Otra de las aplicaciones potenciales de nuestro sistema es favorecer el **ensamblaje de complejos supramoleculares** en células para su posterior estudio estructural. Muchos complejos funcionales formados por múltiples proteínas son difíciles de obtener mediante los sistemas clásicos de expresión de proteínas, ya que probablemente, la dispersión de sus componentes individuales en la célula dificulte su formación. Los viriones de reovirus son complejos supramoleculares que se ensamblan de una manera extremadamente eficiente en la célula infectada, y la alta eficiencia probablemente se

deba a que los componentes de los viriones son reclutados a las inclusiones de μ NS de una manera ordenada y selectiva (Touris-Otero *et al.*, 2004a). De esta forma, al concentrarse en un mismo compartimento, aumentan las posibilidades de encontrar los ligandos adecuados. Nuestro sistema permite simular la morfogénesis de los reovirus, pero con proteínas exógenas, las cuales podemos dirigir de forma selectiva a las inclusiones de μ NS o μ NS-Mi. Así, el etiquetado con el dominio Intercoil y con otros dominios, como el Coil1 y Coil2, permitiría incorporar de manera sencilla varias proteínas a las inclusiones, lo que debería favorecer su ensamblaje en complejos.

4- Exposición de epitopos exógenos únicos o múltiples. La facilidad con que conseguimos integrar proteínas exógenas en las inclusiones y la posibilidad de purificarlas de forma simple, nos sugiere que también podrían utilizarse como una plataforma de exposición de epitopos exógenos. Las inclusiones purificadas constituyen un material particulado y se ha demostrado que los epitopos expuestos en material particulado estimulan la respuesta inmune, tanto celular como humoral, de una manera mucho más eficaz que las proteínas solubles (Roy, 1996). Por tanto, nuestro sistema podría utilizarse para generar partículas que expongan diversos epitopos de interés médico o veterinario y de esta forma podrían utilizarse como vacunas. La exposición de diversos epitopos es perfectamente aplicable, ya que hemos demostrado que las inclusiones formadas por μ NS y μ NS-Mi son capaces de incorporar a la vez varias proteínas etiquetadas con el Intercoil. Las posibles ventajas de nuestro método serían: i) estar constituidas por material particulado; ii) facilidad de producción y purificación; iii) seguridad biológica, ya que no utiliza virus patógenos vivos sino sus componentes proteicos; y iv) podemos exponer en la misma partícula múltiples epitopos diferentes. De esta forma, podríamos integrar en la misma partícula diferentes epitopos inmunogénicos de un mismo virus o diferentes epitopos de virus diferentes o de serotipos distintos, lo que sin duda ayudaría a mejorar la eficacia de las vacunas existentes.

5- Detección de interacciones entre proteínas. En la última parte de este trabajo hemos demostrado que el etiquetado de proteínas con el dominio Intercoil puede utilizarse como un sistema para detectar la interacción entre proteínas *in vivo*, dentro del contexto celular. Existen en la actualidad varios sistemas diseñados para este mismo fin, de los cuales el sistema del doble híbrido es el más popular. Este sistema se basa en

expresar dos proteínas de fusión: una en que la proteína X está fusionada al dominio de unión a DNA del factor de transcripción GCN4; y otra en que la proteína Y está fusionada al dominio de activación de transcripción del mismo factor GCN4. Si X e Y interactúan, se supone que reconstituyen un GCN4 funcional en la célula que activará la transcripción de un gen reportero. Entre los problemas más obvios de este sistema están: i) aunque X e Y interactúen, la arquitectura de dicha interacción muchas veces no permite la reconstrucción de un GCN4 funcional; y ii) las fusiones pueden alterar las estructuras de los diferentes dominios de GCN4 o de los dominios de interacción de las proteínas problema.

Recientemente se ha descrito un sistema que guarda alguna relación con el que nosotros proponemos en este trabajo, porque utiliza la formación de inclusiones por la proteína μ NS de los reovirus de mamífero como una plataforma para detectar interacciones entre proteínas en células de mamífero (Miller *et al.*, 2007) y que también ha sido adaptado para usarse en levaduras (Schmitz *et al.*, 2009). El sistema empleado es, sin embargo, radicalmente diferente al nuestro ya que no dirige las proteínas problema a las inclusiones, sino que la proteína problema se fusiona al extremo N-terminal de la región mínima de μ NS con capacidad para formar inclusiones (la correspondiente a nuestra μ NS-Mi) para que la fusión genere inclusiones citoplasmáticas y atraiga a ellas al ligando de la proteína problema. En el sistema de levaduras, estos autores demuestran que su sistema es superior al del doble híbrido en el número y tipo de interacciones detectadas, al menos con las proteínas ensayadas en dicho trabajo. Sin embargo, los autores reconocen los problemas de su sistema, entre los que destacamos: i) ciertas proteínas pueden plegarse incorrectamente al fusionarlas con la μ NS-Mi y perder su capacidad de interacción con sus ligandos; ii) algunas proteínas pueden interferir con la capacidad de formación de inclusiones de μ NS-Mi y o bien, no formarlas, o generar agregados intracelulares, por lo que la detección de interacciones se vería enormemente alterada. iii) la localización intracelular de la proteína problema o de su ligando pudiera no ser la adecuada para ser detectada en inclusiones citoplasmáticas.

Nuestro sistema es mucho más versátil que el descrito para la proteína μ NS del reovirus de mamífero y además solventa sus principales problemas, ya que i) las posibilidades de que el etiquetado genere un mal plegamiento son menores al reducirse el tamaño de la etiqueta (66 residuos de nuestro Intercoil, por 250 residuos de su μ NS-

Mi) y porque nuestra etiqueta no forma inclusiones por sí misma; ii) la proteína problema no debería interferir en la formación de inclusiones, ya que es dirigida a las inclusiones que forman μ NS, μ NS-Mi y sus derivados: de hecho tenemos muchas opciones diferentes para formar las inclusiones, las cuales podrán ser fluorescentes o no; iii) otra ventaja adicional es que podemos integrar varias proteínas diferentes a la vez en la misma inclusión; y iv) por último, hemos adaptado nuestro sistema al compartimento nuclear donde podremos detectar de una forma natural las interacciones entre proteínas nucleares.

6- Secuestro de proteínas, expresión de proteínas tóxicas y secuestro de ligandos.

Otra posible utilidad de nuestro sistema es para la expresión de proteínas citotóxicas. Muchas proteínas de distintos orígenes son difíciles de estudiar bioquímicamente y estructuralmente porque su toxicidad impide su expresión y purificación por los sistemas clásicos. El sistema de secuestro aquí descrito podría permitir la expresión de algunas de estas proteínas citotóxicas al retenerlas en los cuerpos de inclusión. De hecho, en este trabajo hemos demostrado como la proteína p53 cuya localización es mayoritariamente nuclear pasa a localizarse en las inclusiones citoplasmáticas generadas por μ NS y derivados. De la misma forma, nuestro sistema podría usarse para cambiar la localización subcelular de proteínas y así evitar su posible toxicidad, siempre que dicha toxicidad sea dependiente de su localización intracelular. El disponer de diferentes sistemas alternativos y con diferente localización celular (citoplasmático y nuclear) nos resultará muy útil para conseguir este objetivo.

Por último, nuestro sistema de secuestro también permitiría eliminar del citoplasma o del núcleo a ligandos que se unen la proteína problema, los cuales quedarían secuestrados en las inclusiones. Así, hemos demostrado que el antígeno T abandona su lugar habitual y pasa a localizarse en las inclusiones de μ NS cuando su ligando, la proteína p53 se fusiona al dominio Intercoil y se co-expresa con μ NS. De esta manera se podrían realizar estudios funcionales *in vivo* basados en el secuestro de ligandos de proteínas problema etiquetadas con el dominio Intercoil.

VI. CONCLUSIONES

De los estudios realizados podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Las factorías virales y las inclusiones formadas por μ NS no son agresomas, no están asociadas al citoesqueleto y no necesitan de los microtúbulos celulares para su formación y maduración.
2. Las inclusiones formadas por la proteína μ NS expresada en células de insecto contiene fundamentalmente μ NS, sugiriendo que la capacidad de autoasociación de esta proteína es suficiente para poder formar inclusiones.
3. La región mínima de μ NS con capacidad para formar inclusiones comprende los residuos 448-635, y contiene los dominios Coil 1, Coil 2, Intercoil y C-tail.
4. El Coil 1 y la región C-tail son necesarios para formar inclusiones, aunque pueden ser sustituidos por un dominio de dimerización, lo que sugiere que participan en la interacción entre monómeros para formar oligómeros basales.
5. El dominio C-tail juega un papel clave en la orientación de los monómeros de μ NS para formar oligómeros basales, controlando así la forma de las inclusiones y la eficiencia de su formación.
6. La región Intercoil puede utilizarse para etiquetar proteínas y provocar su integración en las inclusiones citoplasmáticas que generan μ NS, μ NS-Mi o sus respectivas fusiones con la proteína verde fluorescente (GFP). Los resultados de este estudio demostraron que este etiquetado podría utilizarse para: i) secuestrar proteínas en las inclusiones; ii) purificar proteínas activas de forma simple asociadas a las inclusiones en células de insecto; iii) detección de interacciones intracelulares proteína-proteína en el citoplasma o en el núcleo de células eucariotas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, S. H., y DeCaprio, J. A.** (2001). Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin. Cancer Biol.* **11**:15–23.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffe, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-402. Review.
- Antczak, J. B., y Joklik, W. K.** Reovirus genome segment assortment into progeny genomes studied by the use of monoclonal antibodies directed against reovirus proteins. (1992). *Virology* **187**:760-76.
- Aponte, C., Poncet, D., y Cohen., J.** Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. (1996). *J Virol.* **70**:985-91.
- Arnold, M. M., Murray, K. E., y Nibert, M. L.** (2008). Formation of the factory matrix is an important, though not a sufficient function of nonstructural protein mu NS during reovirus infection. *Virology* **375**:412-23.
- Attoui, H., Billoir, F., Biagini, P., de Micco, P., y de Lamballerie, X.** (2000). Complete sequence determination and genetic analysis of Banna virus and Kadipiro virus: proposal for assignment to a new genus (Seadornavirus) within the family Reoviridae. *J. Gen. Virol.* **81**:1507-15.
- Banerjee, A. K., y Shatkin, A. J.** (1970). Transcription in vitro by reovirus-associated ribonucleic acid-dependent polymerase. *J. Virol.* **1**:1-11.
- Barton, E. S., Forrest, J. C., Connolly, J. L., Chappell, J. D., Liu, Y., Schnell, F. J., Nusrat, A., Parkos, C. A., y Dermody, T. S.** (2001). Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* **104**:441-51.
- Becker, M. M., Goral, M. I., Hazelton, P. R., Baer, G. S., Rodgers, S. E., Brown, E. G., Coombs, K. M., y Dermody, T. S.** (2001). Reovirus sigmaNS protein is required for nucleation of viral assembly complexes and formation of viral inclusions. *J. Virol.* **75**:1459-75
- Bellamy, A. R., y Joklik, W. K.** (1967). Studies on reovirus RNA. II. Characterization of reovirus messenger RNA and of the genome RNA segments from which it is transcribed. *J. Mol. Biol.* **29**:19-26.
- Benavente, J. y Martínez-Costas, J.** (2006). Early steps in avian reovirus morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **309**:67-85..
- Benavente, J., y Shatkin, A. J.** (1988). Avian reovirus mRNAs are nonfunctional in infected mouse L cells: translational basis for virus host-range restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:4257-61.
- Bodelón, G., Labrada, L., Martínez-Costas, J., y Benavente, J.** (2002). Modification of late membrane permeability in avian reovirus-infected cells. Viroporin activity of the S1-encoded nonstructural p10 protein. *J. Biol. Chem.* **277**:17789-96.

- Bodelon, G., Labrada, L., Martínez-Costas J., y Benavente, J.** (2001). The avian reovirus genome segment S1 is a functionally tricistronic gene that expresses one structural and two nonstructural proteins in infected cells. *Virology* **290**:181–191.
- Borsa, J., Copps, T. P., Sargent, M. D., Long, D. G., y Chapman, J. D.** (1973). New intermediate subviral particles in the in vitro uncoating of reovirus virions by chymotrypsin. *J. Virol.* **11**:552-64.
- Boyce, M., Celma, C. C., y Roy, P.** (2008). Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J. Virol.* **82**:8339-48.
- Breun, L. A., Broering, T. J., McCutcheon, A. M., Harrison, S. J., Luongo, C. L., y Nibert, M. L.** (2001). Mammalian reovirus virus L2 gene and lambda2 core spike protein sequences and whole-genome comparisons of reovirus virus type 1 Lang, type 2 Jones, and type 3 Dearing. *Virology* **287**:333–48.
- Broering, T. J., Arnold, M. M., Miller, C. L., Hurt, J. A., Joyce, P. L., y Nibert, M. L.** (2005). Carboxyl-proximal regions of reovirus nonstructural protein muNS necessary and sufficient for forming factory-like inclusions. *J. Virol.* **79**:6194-206.
- Broering, T. J., Kim, J., Miller, C. L., Piggott, C. D., Dinoso, J. B., Nibert, M. L. y Parker, J. S.** (2004). Reovirus nonstructural protein muNS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions. *J. Virol.* **78**:1882-92.
- Broering, T. J., Parker, J. S., Joyce, P. L., Kim, J. y Nibert, M. L.** (2002). Mammalian reovirus nonstructural protein microNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein micro2 in transfected cells. *J. Virol.* **76**:82851 -97.
- Carrasco, L.** (1994). Entry of animal viruses and macromolecules into cells. *FEBS Lett.* **350**:151-4.
- Carrasco, L.** (1995). Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adv. Virus Res.* **45**:61–112.
- Chandran, K., Farsetta D. L., y Nibert, M. L.** (2002). Strategy for nonenveloped virus entry: a hydrophobic conformer of the reovirus membrane penetration protein micro 1 mediates membrane description. *J. Virol.* **76**:9920-33.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., y Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:2172-5.
- Clemens, M.** (1997). PKR: A protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**:945–9.

- Costas-Iglesias, C., Martínez-Costas, J., Bodelón, G., y Benavente, J.** (2005). The second open reading frame of the avian reovirus S1 gene encodes a transcription-dependent and CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling protein. *J. Virol.* **79**:2141-2150.
- Dibb, N. J., Maruyama, I. N., Krause, M., y Karn, J.** (1989). Sequence analysis of the complete *Caenorhabditis elegans* myosin heavy chain gene family. *J. Mol. Biol.* **205**:603-13.
- Dryden, K. A., Wang, G., Yeager, M., Nibert, M. L., Coombs, K. M., Furlong, D. B., Fields, B. N., y Baker, T.S.** (1993). Early steps in reovirus infection are associated with dramatic changes in supramolecular structure and protein conformation: analysis of virions and subviral particles by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell Biol.* **122**:1023-41.
- Duncan, R.** (1996). The low pH-dependent entry of avian reovirus is accompanied by two specific cleavages of the major outer capsid protein G1C. *Virology* **219**:179-89.
- Duncan, R., Corcoran, J., Shou, J., y Stoltz, D.** (2004). Reptilian reovirus: a new fusogenic Orthoreovirus species. *Virology* **250**:263-72.
- Duncan, R., y Sullivan, K.** (1998). Characterization of two avian reoviruses that exhibit strain-specific quantitative differences in their syncytium-inducing and pathogenic capabilities. *Virology* **250**:263-72.
- Ellis, M. N., Eidson, C. S., Brown, J., y Kleven, S. H.** (1983). Studies of interferon induction and interferon sensitivity of avian reoviruses. *Avian Dis.* **27**:927-36.
- Estes, M. K.** (2001). Rotaviruses and Their Replication, p. 1747-1777. In D.M. Knipe, P.M. Howley (ed.), *Field's Virology*, 2nd ed., vol. 2., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
- Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F., y Burrone, O. R.** (1999). Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J. Gen. Virol.* **80**:333-9.
- Fields, B. N., Raine, C. S., y Baum, S. G.** (1971). Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: defects in viral maturation as studied by immunofluorescence and electron microscopy. *Virology* **43**:569-78.
- Gluzman, Y.** (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**:175 -182.
- González-Lopez, C., Martínez-Costas, J., Esteban, M., y Benavente, J.** (2003). Evidence that avian reovirus sigmaA protein is an inhibitor of the double-strandedRNA-dependent protein kinase. *J. Gen. Virol.* **84**:1629-39.
- Goodbourn, S., Didcock, L., y Randall, R. E.** (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, anti antiviral viral response and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* **81**:2341-64.

- Grande, A., y Benavente, J.** (2000). Optimal conditions for the growth, purification and storage of the avian reovirus S1133. *J. Virol. Methods* **85**:43-54.
- Grande, A., Costas, C., y Benavente, J.** (2002). Subunit composition and conformational stability of the oligomeric form of the avian reovirus cell-attachment protein σC . *J. Gen. Virol.* **83**:131-9.
- Grande, A., Rodriguez, E., Costas, C., Everitt, E., y Benavente, J.** (2000). Oligomerization and cell-binding properties of the avian reovirus cell-attachment protein sigmaC. *Virology* **274**:367-77.
- Guardado-Calvo, P., Fox, G. C., Hermo Parrado, X. L., Llamas-Saiz, A. L., Costas, C., Martínez-Costas, J., Benavente, J., y van Raaij, M. J.** (2005). Structure of the carboxy-terminal receptor-binding domain of avian reovirus fibre sigmaC. *J. Mol. Biol.* **354**:137-49.
- Guardado-Calvo, P., Fox, G. C., Llamas-Saiz, A. L., y van Raaij, M. J.** (2009). Crystallographic structure of the alpha-helical triple coiled-coil domain of avian reovirus S1133 fibre. *J. Gen. Virol.* **90**:672-7
- Guardado-Calvo, P., Vazquez-Iglesias, L., Martinez-Costas, J., Llamas-Saiz, A. L., Schoehn, G., Fox, G. C., Hermo-Parrado, X. L., Benavente, J., y van, Raaij, M. J.** (2008). Crystal structure of the avian reovirus inner capsid protein sigmaA. *J. Virol.* **82**:11208-16.
- Guo, J. T. y Xu, Y.** (2008). Towards modeling of amyloid fibril structures. *Front. Biosci.* **13**:4039-50.
- Haller, O., Kochs, G., y Weber, F.** (2006). The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* **344**:119–30.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-80.
- Harvey, J. D., Bellamy, A. R., Earnshaw, W. C., y Schutt, C.** (1981). Biophysical studies of reovirus type 3. IV. Low-angle x-ray diffraction studies. *Virology* **112**:240-9.
- Herman, B., y Lemasters, J. J., eds.** (1993). Light microscopy: emerging methods and applications. *Academic Press*.
- Herme-Parrado, X. L., Guardado-Calvo, P., Llamas-Saiz, A. L., Fox, G. C., Vazquez-Iglesias, L., Martínez-Costas, J., Benavente, J., y van Raaij, M. J.** (2007). Crystallization of the avian reovirus double-stranded RNA-binding and core protein sigmaA. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**:426-9.
- Hopfner, K. P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R. A., Usui, T., Owen, B. A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J. L., McMurray, C. T., Carney, J. P., Petrini, J. H., y J. A. Tainer.** (2002). The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418**:562-566.

- Horscroft, N. J., y Roy, P.** (2000). NTP binding and phosphohydrolase activity associated with purified bluetongue virus non-structural protein NS2. *J. Gen. Virol.* **81**:1961-5.
- Hsiao, J., Martínez-Costas, J., Benavente, J., y Vakharia, V. N.** (2002). Cloning, expression, and characterization of avian reovirus guanylyltransferase. *Virology* **296**:288-99.
- Huismans, H., van Dijk, A. A., y Bauskin, A. R.** (1987). In vitro phosphorylation and purification of a nonstructural protein of bluetongue virus with affinity for single-stranded RNA. *J. Virol.* **61**:3589-95.
- Huse, M., Eck, M. J., y Harrison, S. C.** (1998). A Zn²⁺ ion links the cytoplasmic tail of CD4 and the N-terminal region of Lck. *J. Biol. Chem.* **273**:18729-18733.
- Jack, E., Newsome, M., Stockley, P. G., Radford, S. E., y Middleton, D. A.** (2006). The organization of aromatic side groups in an amyloid fibril probed by solid-state ²H and ¹⁹F NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **128**:8098-9.
- Jayaram, H., Taraporewala, Z., Patton, J. T., y Prasad, B. V.** (2002). Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature* **417**:311-5.
- Jones R. C.** (2000). Avian reovirus infections. *Rev. Sci. Tech.* **19**:614-25.
- Jordan, L. E., y Mayor, H. D.** (1962). The fine structure of reovirus, a new member of the icosahedral series. *Virology* **17**:597-599.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E.** (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**:499 –509
- Kant, A., Balk, F., Born, L., van Roozelaar, D., Heijmans, J., Gielkens, A., y Huurne, A.** (2003). Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the sigma C protein. *Vet. Res.* **34**:203-12.
- Kar, A. K., Bhattacharya, B., y Roy, P.** (2007). Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Mol. Biol.* **22**: 8-4
- Kattoura, M. D., Chen, X., y Patton, J. T.** (1994). The rotavirus RNA-binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with the viral RNA polymerase. *Virology* **202**:803-13.
- Kattoura, M. D., Clapp, L. L., y Patton, J. T.** (1992). The rotavirus nonstructural protein, NS35, possesses RNA-binding activity in vitro and in vivo. *Virology* **191**:698-708.
- Ketchum, A. S., Stewart, C. T., Stewart, M., y Kiehart, D. P.** (1990). Complete sequence of the Drosophila nonmuscle myosin heavy-chain transcript: conserved sequences in the myosin tail and differential splicing in the 5' untranslated sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:6316-20.

- Kielian, M., y Jungerwirth, S.** (1990). Mechanisms of enveloped virus entry into cells. *Mol. Biol. Med.* **7**:17-31.
- Kim, P. W., Sun, Z. Y., Blacklow, S. C., Wagner, G., y Eck, M. J.** (2003). A zinc clasp structure tethers Lck to T-cell coreceptors CD4 and CD8. *Science* **301**:1725-1728.
- Kobayashi, T., Chappell, J.D., Danthi, P., y Dermody, T.S.** (2006). Gene-specific inhibition of reovirus replication by RNA interference. *J. Virol.* **80**:9053-63
- Kobayashi, T., Antar, A. A., Boehme, K. W., Danthi, P., Eby, E. A., Guglielmi, K. M., Holm, G. H., Johnson, E. M., Maginnis, M. S., Naik, S., Skelton, W. B., Wetzel, J. D., Wilson, G. J., Chappell, J. D., y Dermody, T. S.** (2007). A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* **1**:147-57.
- Kopito, R. R.** (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* **10**:524-30.
- Kozak, M.** (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* **266**:19867-70.
- Kozak, M.** (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene.* **299**:1-34.
- Labrada, L., Bodelón, G., Viñuela, J., y Benavente J.** (2002). Avian reoviruses cause apoptosis in cultured cells: viral uncoating, but not viral gene expression, is required for apoptosis induction. *J. Virol.* **76**:7932-41.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
- Landa, A., Laclette, J. P., Nicholson-Weller, A., y Shoemaker, C. B.** (1993). cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**:343-7.
- Lupas, A.** (1996). Prediction and Analysis of Coiled-Coil Structures. *Meth. Enzymology* **266**:513-525.
- Lupas, A., Van Dyke, M., y Stock, J.** (1991). Predicting Coiled Coils from Protein Sequences. *Science* **252**:1162-1164.
- Lau, R. Y., van Alstyne, D., Berckmans, R., y Graham, A. F.** (1975). Synthesis of reovirus-specific polypeptides in cells pretreated with cycloheximide. *J. Virol.* **16**:470-8.
- Li, J. K., Keene, J. D., Scheible, P. P., y Joklik, W. K.** (1980). Nature of the 3'-terminal sequences of the plus and minus strands of the S1 gene of reovirus serotypes 1, 2 and 3. *Virology* **105**:41-51.

- Liemann, S., Chandran, K., Baker, T. S., Nibert, M. L., y Harrison, S. C.** (2002). Structure of the reovirus membrane-penetration, $\mu 1$, in a complex with its protector protein, $\sigma 3$. *Cell* **108**:283–295.
- Lupiani, B., Subramanian, K., y Samal, S. K.** (1995). Aquareoviruses. *Annu. Rev. Fish Dis.* **5**:175–208.
- Lymperopoulos, K., Wirblich, C., Brierley, I., y Roy, P.** (2003). Sequence specificity in the interaction of Bluetongue virus non-structural protein 2 (NS2) with viral RNA. *J. Biol. Chem.* **278**:31722–30.
- Mallo, M., Martínez-Costas, J., y Benavente, J.** (1991). Avian reovirus S1133 can replicate in mouse L cells: effect of pH and cell attachment status on viral infection. *J. Virol.* **65**:5499–505.
- Martínez-Costas, J., González-López, C., Vakharia, V. N., y Benavente, J.** (2000). Possible involvement of the double-stranded RNA-binding core protein σA in the resistance of avian reovirus to interferon. *J. Virol.* **74**:1124–31.
- Martínez-Costas, J., Grande, A., Varela, R., García-Martínez, C. and Benavente, J.** (1997). Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *J. Virol.* **71**: 59–64.
- Martínez-Costas, J., Varela, R., y Benavente, J.** (1995) Endogenous enzymatic activities of the avian reovirus S1133: identification of the viral capping enzyme. *Virology*. **206**:1017–26.
- Mateu, M. G.** (2002). Conformational stability of dimeric and monomeric forms of the C-terminal domain of human immunodeficiency virus-1 capsid protein. *J. Mol. Biol.* **318**: 519–531.
- Mertens P.** (2004). The dsRNA viruses. *Virus Res.* **101**:3–13.
- Mertens, P. P. C., Attoui, H., Duncan, R. and Dermody, T. S.** (2005). *Reoviridae*. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 447–454. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. London: Elsevier/Academic Press.
- Metcalf, P., Cyrklaff, M., y Adrian, M.** (1991). The three-dimensional structure of reovirus obtained by cryo-electron microscopy. *EMBO J.* **11**:3129–36.
- Miller, C. L., Arnold, M. M., Broering, T. J., Eichwald, C., Kim, J., Dinoso. J. B., y Nibert, M. L.** (2007). Virus-derived platforms for visualizing protein associations inside cells. *Mol. Cell Proteomics* **6**:1027–38.
- Miller, C. L., Broering, T. J., Parker, J. S., Arnold, M. M. y Nibert, M. L.** (2003). Reovirus σ NS protein localizes to inclusions through an association requiring the μ NS amino terminus. *J. Virol.* **77**:4566–76.

- Mitsui, H., Nakatani, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Nishikawa, K., y Takahashi, H.** (1994). Sequencing and characterization of the kinesin-related genes katB and katC of *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* **25**:865-76.
- Mohan, K. V., Muller, J., y Atreya, C. D.** (2003). The N- and C-terminal regions of rotavirus NSP5 are the critical determinants for the formation of viroplasm-like structures independent of NSP2. *J. Virol.* **22**:12184-92.
- Muhlschlegel, F., Sygulla, L., Frosch, P., Massetti, P., y Frosch M.** (1993). Paramyosin of *Echinococcus granulosus*: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen. *Parasitol. Res.* **79**:660-6.
- Nason, E. L., Samal, S. K., y Prasad, B. V. V.** (2000). Trypsin-induced structural transformation in aquareovirus. *J. Virol.* **74**:6546–55.
- Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E., y Wileman, T.** (2007). A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv. Virus Res.* **70**:101-82.
- Ni, Y., y Ramig, R. F.** (1993). Characterization of avian reovirus induced cell fusion: The role of viral structural proteins. *Virology* **194**:705–14.
- Nibert, M. L. y Fields B. N.** (1992). A carboxy-terminal fragment of protein $\mu 1/\mu 1C$ is present in infectious subviral particles of mammalian reoviruses and is proposed to have a role in penetration. *J. Virol.* **11**:6408-18
- Nibert, M. L., y Schiff, A.** (2001). Reoviruses and their replication. In virology (B. N. Fields, Ed.), Lippincott-Raven.
- Nilsson, M. R.** (2004). Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* **34**:151-60.
- Noad, L., Shou, J., Coombs, K. M., y Duncan, R.** Sequences of avian reovirus M1, M2 and M3 genes and predicted structure/function of the encoded μ proteins. *Virus Res.* **116**:45-57
- Nonoyama, M., Millward, S., y Graham, A. F.** (1974). Control of transcription of the reovirus genome. *Nucleic Acids Res.* **1**:373-85.
- Odegard, A. L., Chandran, K., Liemann, S., Harrison, S. C., y Nibert, M. L.** (2003). Disulfide bonding among $\mu 1$ trimers in mammalian reovirus outer capsid: a late and reversible step in virion morphogenesis. *J. Virol.* **77**:5389–400.
- Olland, A. M., Jane-Valbuena, J., Schiff, L. A., Nibert, M. L., and Harrison, S. C.** (2001). Structure of the reovirus outer capsid and dsRNA-binding protein $\sigma 3$ at 1.8 Å resolution. *EMBO J.* **20**:979-89.
- Olson, N. O.** (1978). In Disease of Poultry (M.S. Hofstad, ed). Ames-Iowa.

- Palmer, E. L., y Martin, M. L.** (1977). The fine structure of the capsid of reovirus type 3. *Virology* **76**:109-13.
- Parker, J. S. L., Broering, T. J., Kim, J., Higgins, D. E., y Nibert, M. L.** (2002). Reovirus core protein $\mu 2$ determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules. *J. Virol.* **76**:4483-96.
- Patton, J. T., Salter-Cid, L., Kalbach, A., Mansell, E. A., y Kattoura, M.** (1993). Nucleotide and amino acid sequence analysis of the rotavirus nonstructural RNA-binding protein NS35. *Virology* **192**:438-46.
- Patton, J. T., y Spencer E.** (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* **277**:217-25.
- Poncet, D., Lindenbaum, P., L'Haridon, R., y Cohen, J.** (1997). In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms. *J. Virol.* **71**:34-41.
- Rebouillat, D., y Hovanessian, A. G.** (1999). The human 2,5- oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic proper properties. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**:295–308.
- Reinisch, K. M., Nibert, M. L., y Harrison, S. C.** (2000). Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature.* **404**: 960-7.
- Rhim, J. S., Jordan, L. E., y Mayor, H. D.** (1962). Cytochemical, fluorescent antibody and electron microscopic studies on the growth of reovirus (ECHO 10) in tissue culture. *Virology* **17**:342-55.
- Robertson, M. D., y Wilcox, G. E.** (1986). Avian reovirus. *Vet. Bull.* **56**:759-66.
- Rosenberger, J. K., Sterner, F. J., Botts, S., Lee, K. P., y Margolin, A.** (1989). In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. I. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates. *Avian Dis.* **33**:535-44.
- Roy, P.** (1996). Genetically engineered particulate virus-like structures and their use as vaccine delivery systems. *Intervirology* **39**:62-71
- Roy, P.** (2001). Orbiviruses and their replication. In: Fields' Virology (Fields, B.N.,ed.), Fourth Edition. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, New York, USA.pp.1723-1727.
- Sabin, A. B.** (1959). Reovirus: a new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO 10 is described. *Science* 1387-95.
- Sachse, C., Xu, C., Wieligmann, K., Diekmann, S., Grigorieff, N., y Fändrich, M.** (2006). Quaternary structure of a mature amyloid fibril from Alzheimer's A β (1-40) peptide. *J. Mol. Biol.* **362**:347-54.

- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T.** (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sarkar, G., Pelletier, J., Bassel-Duby, R., Jayasuriya, A., Fields, B. N., y Sonenberg, N.** (1985). Identification of a new polypeptide coded by reovirus gene S1. *J. Virol.* **54** :720-5.
- Sen, G. C.** (2001). Viruses and interferons. *Ann. Rev. Microbiol.* **55**:255–81.
- Schmitz, A. M., Morrison, M. F., Agunwamba, A. O., Nibert, M. L., and Lesser, C. F.** (2009). Protein interaction platforms: visualization of interacting proteins in yeast. *Nat. Methods* **6**:500-2.
- Schnitzer, T. J.** (1985). Protein coding assignment of the S genes of the avian reovirus S1133. *Virology* **141**:167-70.
- Schnitzer, T.J., Ramos, T., y Gouvea, V.** (1982). Avian reovirus polypeptides: analysis of intracellular virus-specified products, virions, top component, and cores. *J. Virol.* **43**:1006-14.
- Shapouri, M. R., Arella, M., y Silim, A.** (1996). Evidence for the multimeric nature and cell binding ability of avian reovirus sigma 3 protein. *J. Gen. Virol.* **77**:1203-10.
- Shapouri, M. R., Kane, M., Letarte, M., Bergeron, J., Arella, M., y Silim, A.** (1995). Cloning, sequencing and expression of the S1 gene of avian reovirus. *J. Gen. Virol.* **76**:1515-20.
- Shatkin, A. J., y LaFiandra, A. J.** (1972). Transcription by infectious subviral particles of reoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **10**:698-706.
- Shatkin, A. J., y Sipe, J. D.** (1968). RNA polymerase activity in purified reoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **61**:1462-9.
- Shih, W. L., Hsu, H. W., Liao, M. H., Lee, L. H., y Liu, H. J.** (2004). Avian reovirus sigmaC protein induces apoptosis in cultured cells. *Virology* **321**:65-74.
- Shmulevitz, M., y Duncan, R.** (2000). A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *EMBO J.* **19**:902-12.
- Shmulevitz, M., Corcoran, J., Salsean, J., y Duncan, R.** (2004b). Cell-cell fusion induced by the avian reovirus membrane fusion protein is regulated by protein degradation. *J. Virol.* **78**:5996-6004.
- Shmulevitz, M., Epand, R. F., Epand, R. M., y Duncan, R.** (2004a). Structural and functional properties of an unusual internal fusion peptide in a nonenveloped virus membrane fusion protein. *J. Virol.* **78**:2808-18.

- Shmulevitz, M., Salsman, J., y Duncan, R.** (2003). Palmytoylation, membraneproximal basic residues, and transmembrane glycine residues in the reovirus p10 protein are essential for syncytium formation. *J. Virol.* **77**:9769-79.
- Shmulevitz, M., Yameen, Z., Dawe, S., Shou, J., O'Hara, D., Holmes, I., y Duncan, R.** (2002). Sequential partially overlapping gene arrangement in the tricistronic S1 genome segments of avian reovirus and Nelson Bay reovirus: implications for translation initiation. *J. Virol.* **76**:609-618.
- Silverstein, S. C., y Schur, P. H.** (1970). Immunofluorescent localization of double stranded RNA in reovirus-infected cells. *Virology* **41**:564-66.
- Spandidos, D. A., y Graham, A. F.** (1976b). Nonpermissive infection of L cells by an avian reovirus: restricted transcription of the viral genome. *J. Virol.* **19**:977-84.
- Spandidos, D. A., y Graham, A. F.** (1976a). Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J. Virol.* **19**:968-76.
- Taraporewala, Z. F., Chen, D., y Patton, J. T.** (2001). Multimers of the bluetongue virus nonstructural protein, NS2, possess nucleotidyl phosphatase activity: similarities between NS2 and rotavirus NSP2. *Virology* **280**:221-31.
- Taraporewala, Z., Chen, D., y Patton, J. T.** (1999). Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J. Virol.* **73**:9934-43.
- Thomas, C. P., Booth, T. F., y Roy, P.** (1990). Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. *J. Gen. Virol.* **71**:2073-83.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, y T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-80.
- Torres-Vega, M. A., Gonzalez, R. A., Duarte, M., Poncet, D., Lopez, S., y Arias, C. F.** (2000). The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J. Gen. Virol.* **81**:821-30
- Tourís-Otero, F., Cortez-San Martín, M., Martínez-Costas, J., y Benavente, J.** (2004b). Avian reovirus morphogenesis occurs within viral factories and begins with the selective recruitment of sigmaNS and lambdaA to microNS inclusions. *J. Mol. Biol.* **341**:361-74.
- Touris-Otero, F., Martínez-Costas, J., Vakharia, V.N., y Benavente, J.** (2004a) Avian reovirus nonstructural protein microNS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein sigmaNS to these structures. *Virology* **319**:94-106.

- Tourís-Otero, F., Martínez-Costas, J., Vakharia, V. N., y Benavente, J.** (2005). Characterization of the nucleic acid-binding activity of the avian reovirus non-structural protein sigma NS. *J. Gen. Virol.* **86**:1159-69.
- Van der Heide L.** (2000). The history of avian reovirus. *Avian Dis.* **44**:638-41.
- Van der Heide, L., y Kalbac, M.** (1975). Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a Connecticut viral isolant as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders. *Avian Dis.* **19**:683-8.
- Varela, R., y Benavente, J.** (1994). Protein coding assignment of avian reovirus strain S1133. *J. Virol.* **68**:6775-7.
- Varela, R., Martínez-Costas, J., Mallo, M. y Benavente, J.** (1996). Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus proteins. *J. Virol.* **70**:2974–2981.
- Vázquez-Iglesias, L., Lostalé-Seijo, I., Martínez-Costas, J. y Benavente J.** (2009). Avian reovirus sigmaA localizes to the nucleolus and enters the nucleus by a nonclassical energy- and carrier-independent pathway. *J. Virol.* **83**:10163-10175.
- Wang, Y. L., y Taylor, D. L., eds.** (1989). Fluorescence microscopy of living cells in culture. Part A: fluorescence analogs, labelling cells and basic microscopy. *Methods in Cell Biol.* vol 29. Academic Press.
- Watanabe, Y., y Graham, A. F.** (1967). Structural units of reovirus ribonucleic acid and their possible functional significance. *J. Virol.* **1**:665-77.
- Wetzel, R.** (1994). Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *Trends Biotechnol.* **12**:193-8.
- Wiebe, M. E., y Joklik, T. W.** (1975). The mechanism of inhibition of reovirus replication by interferon. *Virology* **66**:229-40.
- Wileman, T.** (2006). Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Science*, **312**: 875-8.
- Wileman, T.** (2007). Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design? *Annu. Rev. Microbiol.* **61**:149-67.
- Yanagisawa, M., Hamada, Y., Katsuragawa, Y., Imamura, M., Mikawa, T., y Masaki, T.** (1987). Complete primary structure of vertebrate smooth muscle myosin heavy chain deduced from its complementary DNA sequence. Implications on topography and function of myosin. *J. Mol. Biol.* **198**:143-57.
- Yang, F., Larry, G. Moss, George, N. y Phillips, J. R.** (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **14**:1246-1251

- Yin, P., Keirstead, N. D., Broering, T. J., Arnold, M. M., Parker, J. S., Nibert, M. L., y Coombs, K. M.** (2004). Comparisons of the M1 genome segments and encoded mu2 proteins of different reovirus isolates. *Virol. J.* **23**:1-6.
- Yin, H. S., y Lee, L. H.** (1998). Identification and characterization of RNA-binding activities of avian reovirus non-structural protein sigmaNS. *J. Gen. Virol.* **79**:1411-13.
- Yin, H. S., Shien, J. H., y Lee, L. H.** (2000). Synthesis in *Escherichia coli* of avian reovirus core protein sigmaA and its dsRNA-binding activity. *Virology* **266**:33-41.
- Yin, H. S., Su, Y. P., y Lee, L. H.** (2002). Evidence of nucleotidyl phosphatase activity associated with core protein sigma A of avian reovirus S1133. *Virology* **293**:379-85.
- Zhang, J., Tang, S.B., Walker, D., O'Hara, M.L., Nibert, R., Duncan, y Baker, T.S.** (2005b). Structure of avian *Orthoreovirus* virion by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Virology* **343**:25–35.
- Zhang, X., Ji, Y., Zhang, L., Harrison, S. C., Marinescu, D. C., Nibert, M. L., y Baker, T. S.** (2005a). Features of reovirus outer capsid protein mu1 revealed by electron cryomicroscopy and image reconstruction of the virion at 7.0 Angstrom resolution. *Structure* **13**:1545-57.
- Zhang, X., Walker, S. B., Chipman, P. R., Nibert, M. L., y Baker, T. S.** (2003). Reovirus polymerase lambda 3 localized by cryo-electron microscopy of virions at a resolution of 7.6 Å. *Nat. Struct. Biol.* **10**:1011-18.
- Zweerink, H. J., y Joklik, W. K.** (1970). Studies on the intracellular synthesis of reovirus-specific proteins. *Virology* **41**:501-18.